

Entwicklung von Verfahren zur Bestimmung
iodierter Röntgenkontrastmittel in
unterschiedlichen wässrigen Matrices
mittels HPLC-MS

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Andrea Butzen (geb. Hiep)
aus Kevelaer

Entwicklung von Verfahren zur Bestimmung
iodierter Röntgenkontrastmittel in
unterschiedlichen wässrigen Matrices
mittels HPLC-MS

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Duisburg-Essen

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von
Andrea Butzen (geb. Hiep)
aus
Kevelaer

Referent:	Herr Professor Dr. Heinz-Martin Kuß
Koreferent:	Herr Professor Dr. Torsten Schmidt
Tag der mündlichen Prüfung:	07.02.2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 09/2005 bis 08/2006 am IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gemeinnützige GmbH in Mülheim an der Ruhr angefertigt.

Betreuer: Herr Professor Dr. Heinz-Martin Kuß

Teile der vorliegenden Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Butzen, A., Balsaa, P., Werres, F., Kuß, H.-M.: Iodierte Röntgenkontrastmittel in den Flüssen Ruhr und Rhein – Ergebnisse eines Monitoring-Programms. Vom Wasser. In Bearbeitung, 2006.

Posterpräsentationen:

Butzen, A., Balsaa, P., Werres, F.: Abbauverhalten von Arzneimitteln in Urin. Jahrestagung Wasserchemische Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker. Bad Mergentheim, Mai 2005.

Butzen, A., Werres, F., Balsaa, P.: Untersuchung von iodierten Röntgenkontrastmitteln in wässrigen Matrices und deren Verhalten in der aquatischen Umwelt. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker. Celle, Mai 2006.

Tagungsbeitrag /Kurzvortrag:

Butzen, A.: Abbauverhalten von Arzneimitteln in Urin. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker. Bad Mergentheim, Mai 2005.

Butzen, A.: Untersuchung von iodierten Röntgenkontrastmitteln in wässrigen Matrices und deren Verhalten in der aquatischen Umwelt. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker. Celle, Mai 2006.

Vorträge:

Butzen, A.: Bestimmung von Arzneistoffen in unterschiedlichen wässrigen Systemen mittels HPLC-MS/MS. 16. Doktoranden-Seminar in Hohenroda, 9. Januar 2006.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei all jenen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und zu dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herr Professor Dr. Heinz-Martin Kuß für die Betreuung meiner Arbeit und bin dankbar für jede Kritik an meinem Manuskript. Ich hoffe, dass ich seine Ratschläge umsetzen konnte und der Leser meinem Gedankengang folgen kann.

Besonders möchte ich dem IWW Rheinisch-Westfälisches Institut in Mülheim danken, welches mir ermöglichte meine Arbeit dort anzufertigen.

Ein großer Dank gilt Herr Dr. Friedrich Werres und Herr Dr. Peter Balsaa für die freundliche Aufnahme im Labor. Überaus dankbar bin ich für die wertvollen Gespräche und die geopfert Zeit um analytische Fragestellungen zu diskutieren. Sie gaben mir viele wertvolle Anregungen für diese Arbeit.

Meinen Kollegen vom IWW Sabine Janett, Andrea Krimphoff, Holger Malmedy, Ursula Neuhaus und Susanne Zerebecki danke ich für das angenehme Arbeitsklima. Einen besonderen Dank möchte ich Sabine Janett für ihre ständige Hilfsbereitschaft und guten Zusammenarbeit aussprechen.

Ein Dank gilt auch meinen Eltern und meinem Mann, die mir das Studium ermöglichten. Meinem Mann danke ich insbesondere für die Unterstützung, Kraft und Liebe die mich all die Jahre durch mein Studium begleitet haben. Meinen Schwiegereltern danke ich an dieser Stelle für die Aufnahme meiner Tochter Marie Claire. Ohne die ständige Hilfsbereitschaft wäre es mir nicht möglich gewesen, dass Studium zu absolvieren.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Arzneimittel	2
2.1	Röntgenkontrastmittel	2
3	Harn	7
4	Stand der Analytik	8
4.1	HPLC-MS	9
4.1.1	Matrixeffekte bei der massenspektrometrischen Detektion	15
4.2	Aufarbeitungstechniken für wässrige Proben	15
5	Zielsetzung	18
6	Experimenteller Teil	19
6.1	Geräte und Materialien	19
6.2	Chemikalien	21
6.3	Optimierung der massenspektrometrischen Parameter	24
6.4	Optimierung der chromatographischen Trennung	25
6.5	Untersuchung von Harn induzierten Matrixeffekten	27
6.6	Optimierung der Probenvorbereitung	29
6.6.1	Flüssig/Flüssig-Extraktion	29
6.6.2	Festphasen-Extraktion	30
6.6.2.1	Matrixarme wässrige Proben	30
6.6.2.2	Stark matrixbehafteter wässrige Proben (menschlicher Harn)	32
6.7	Validierung der Analysenverfahren	33
6.7.1	Matrixarme wässrige Proben	33
6.7.2	Stark matrixbehaftete wässrige Proben (menschlicher Harn)	35
6.8	Stabilitätstest der RKM in matrixarmen und stark matrixbehafteten wässrigen Proben	38
6.9	Vorkommen und Verhalten ausgewählter Röntgenkontrastmittel in der aquatischen Umwelt	38
6.9.1	Monitoring iodierter Röntgenkontrastmittel in der Ruhr, im Rhein und in flussnahen Grundwassermessstellen	38
6.9.2	Transportverhalten iodierter Röntgenkontrastmittel in Bodensäulen	39
6.10	Ermittlung der Ausscheidungskurve von Iopromid nach Applikation über den menschlichen Harn	41
7	Ergebnisse und Diskussion	43
7.1	Optimierung der massenspektrometrische Detektion	43

7.2	Optimierung der chromatographischen Trennung	53
7.3	Untersuchung von Harn induzierten Matrixeffekten	59
7.4	Probenvorbereitung	73
7.4.1	Flüssig/Flüssig-Extraktion	73
7.4.2	Festphasen-Extraktion	73
7.4.2.1	Matrixarme wässrige Proben	73
7.4.2.2	Stark matrixbehaftete wässrige Proben	80
7.5	Validierung der Analysenverfahren	89
7.5.1	Matrixarme wässrige Proben	89
7.5.2	Stark matrixbehaftete wässrige Proben (menschlicher Harn)	92
7.5.3	Quantifizierung in unterschiedlichen Matrices über eine externe Kalibrationsreihe	94
7.6	Stabilitätstest der RKM in matrixarmen und stark matrixbehafteten wässrigen Proben	95
7.7	Untersuchungsprogramm ausgewählter Röntgenkontrastmittel in Oberflächengewässer	96
7.8	Untersuchungsprogramm ausgewählter Röntgenkontrastmittel in flussnahen Grundwassermessstellen während eines Hochwasserereignisses	101
7.9	Säulenversuche gefüllt mit unterschiedlichen Materialien	102
7.10	Ermittlung des zeitlichen Verlaufs der Ausscheidung des RKM Iopromid über den menschlichen Harn	105
8	Zusammenfassung	106
9	Anhang	112
9.1	Datensammlung der in der Arbeit verwendeten Abbildungen	112
9.1.1	Einfluss der Ameisensäurekonzentration des Laufmittels auf die Signalintensität der Analyten	112
9.1.2	Ergebnisse der Untersuchung zur Signalunterdrückung bei Anwesenheit von NaCl	112
9.1.3	Ergebnisse der Untersuchung zur Signalunterdrückung bei Anwesenheit von KHSO_4	113
9.1.4	Ergebnisse der Untersuchung zur Signalunterdrückung bei Anwesenheit von KH_2PO_4	113
9.1.5	Ergebnisse der Untersuchung zur Signalunterdrückung bei Anwesenheit von Citronensäure	114
9.1.6	Ergebnisse der Untersuchung zur Signalunterdrückung bei Anwesenheit von Kreatinin	114
9.1.7	Ergebnisse der Untersuchung zur Signalunterdrückung bei Anwesenheit von Harnstoff	115

9.1.8	Ergebnisse zu den durchgeführten Aussalzversuchen	115
9.1.9	Ermittlung der Wiederfindungsraten vor und nach einer Glasfaserfiltration	116
9.1.10	Einfluss der organischen Harn-Inhaltsstoffe auf die Wiederfindung der Analyten im Extrakt.	116
9.1.11	Einfluss der Verdünnung der Harnprobe auf die Anreicherung der Analyten	117
9.1.12	Einfluss eines vor der Anreicherung durchgeführten „Clean-up's“ auf die Wiederfindung (WDF) der Analyten in menschlichen Harn	117
9.1.13	Wiederfindung der untersuchten RKM im Extrakt nach Reinigung über NH ₂ -Kartusche	118
9.1.14	Ergebnisse der Untersuchung von RKM in der Ruhr (Mülheim)	119
9.1.15	Ergebnisse der Untersuchung von RKM im Rhein (Düsseldorf)	120
9.1.16	Ergebnisse der Untersuchung von RKM im Rhein (Rees)	121
9.1.17	Ergebnisse der Untersuchung von RKM am Rhein in GWM 1	122
9.1.18	Ergebnisse der Untersuchung von RKM am Rhein in GWM 1	122
9.1.19	Zeitlicher Verlauf der renalen Ausscheidung des applizierten RKM Iopromid über den menschlichen Harn	123
9.2	Summen- und Strukturformel, Molekulargewicht, CAS-Nummer sowie Massenspektrum der untersuchten RKM, welches zur Quantifizierung verwendet wurde	124

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Grundstruktur triiodierter Röntgenkontrastmittel.....	3
Abbildung 2:	Chemische Strukturformeln der elf in dieser Arbeit untersuchten iodierten Röntgenkontrastmittel.....	6
Abbildung 3:	Darstellung einer vollständig hydrolisierten Kieselgel-Oberfläche.	10
Abbildung 4:	Reaktion zwischen einer Si-OH-Gruppe und einem Organochlorsilan.	10
Abbildung 5:	Schematische Darstellung eines Ionenfallen-Massenspektrometers mit APCI-(atmospheric pressure ionisation) Ionisationsquelle.....	12
Abbildung 6:	Schematischer Aufbau eines APCI-Interfaces.....	13
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des Ionisierungsprozesses in der ESI- Quelle.	13
Abbildung 8:	Schematischer Aufbau eines ESI-Interfaces	14
Abbildung 9:	Schematische Darstellung einer Festphasenextraktion (SPE).	16
Abbildung 10:	Strukturformel des organischen Salzes Chlormequat, das zur Ermittlung der Totzeit eingesetzt wurde.	27
Abbildung 11:	Fließschema der Probenaufarbeitung zur Bestimmung der iodierten Röntgenkontrastmittel in Trink- und Oberflächenwasser.....	31
Abbildung 12:	Lageplan der beiden untersuchten Rhein nahen Grundwasser- messstellen.	39
Abbildung 13:	Schematische Darstellung einer Bodensäule.....	39
Abbildung 14:	Vermutete Strukturformel des einfachen (A) und zweifach (B) deiodierten Precursorions der Amidotrizoesäure	45
Abbildung 15:	Vorschlag zur Fragmentierung des Precursorions $[M+H]^+$ von lobitridol.....	49
Abbildung 16:	Vorschlag zur Fragmentierung des Precursorions $[M+H]^+$ von lopamidol.....	50
Abbildung 17:	Einfluss der Ameisensäurekonzentration des Laufmittels auf die Signalintensität der Analyten. Die Ergebnisse der Signalintensitäten der Analyten mit der Konzentration von 0,5 % Ameisensäure im LM wurden auf 100 % normiert	56
Abbildung 18:	Total-Ionenstrom Chromatogramm (TIC) der elf in dieser Arbeit untersuchten iodierten Röntgenkontrastmittel.	57
Abbildung 19:	Chromatogramm der einzelnen Massenspuren der untersuchten Analyten unter optimierten chromatographischen Bedingungen	58

Abbildung 20:	Schematische Darstellung des Signalverlustes der Analyten in Abhängigkeit von der Konzentration des anorganischen Harn-Inhaltsstoffs NaCl.	59
Abbildung 21:	Schematische Darstellung des Signalverlustes der Analyten in Abhängigkeit von der Konzentration des anorganischen Harn-Inhaltsstoffs KHSO_4	60
Abbildung 22:	Schematische Darstellung des Signalverlustes der Analyten in Abhängigkeit von der Konzentration des anorganischen Harn-Inhaltsstoffs KH_2PO_4	61
Abbildung 23:	Vergleich der Retentionszeiten der iodierten RKM mit den Retentionskurven der anorganischen Harn-Inhaltsstoffe.....	63
Abbildung 24:	Schematische Darstellung des Signalverlustes der Analyten in Abhängigkeit von der Konzentration des organischen Harn-Inhaltsstoffs Kreatinin.	64
Abbildung 25:	Schematische Darstellung des Signalverlustes der Analyten in Abhängigkeit von der Konzentration des organischen Harn-Inhaltsstoffs Citronensäure.....	65
Abbildung 26:	Schematische Darstellung des Signalverlustes der Analyten in Abhängigkeit von der Konzentration des organischen Harn-Inhaltsstoffs Harnstoff.....	66
Abbildung 27:	Vergleich der Retentionszeiten der iodierten RKM mit den Retentionskurven der anorganischen Harn-Inhaltsstoffe.....	67
Abbildung 28:	Retentionskurve des Harn-Substituts.	68
Abbildung 29:	Massenspektrum der Analyten Ioversol (A) [$c = 4 \text{ g/l}$], NaCl (B) [$c = 1 \text{ g/l}$] und die Kombination aus beiden Analyten (C) [$c(\text{Ioversol}) = 4 \text{ g/l}$; $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ g/l}$].	69
Abbildung 30:	Wiederfindung der Analyten im Harn und im Harn-Substitut bezogen auf die Signalintensitäten der Analyten in einer Bezugslösung. Die Konzentration betrug bei allen untersuchten Lösungen 1 mg/l	71
Abbildung 31:	Graphische Darstellung der Signalveränderung bei Verwendung des originalen Harns.	72
Abbildung 32:	Graphische Darstellung der Ergebnisse zu dem in dieser Arbeit durchgeführten Aussalzversuche. Die Wiederfindungsraten sind bezogen auf die Ergebnisse der Konzentration 0 g/l NaCl	79
Abbildung 33:	Graphische Darstellung der ermittelten Wiederfindungsraten vor und nach einer Glasfaserfiltration. Ergebnisse vor der Filtration wurden auf 100% normiert.	80
Abbildung 34:	Darstellung der Ergebnisse zur Ermittlung des Einflusses einer Verdünnung der Harnprobe ($10 \text{ ml Harn auf } x \text{ ml Wasser}$) auf die Wiederfindungsraten einiger ausgewählter Analyten.	81

Abbildung 35:	Einfluss der organischen Harn-Inhaltsstoffe auf die Wiederfindung der Analyten im Extrakt.	82
Abbildung 36:	Einfluss einer vor der Anreicherung durchgeführten Eiweißfällung auf die Wiederfindung (WDF) der Analyten in menschlichem Harn.....	83
Abbildung 37:	Einfluss eines vor der Anreicherung durchgeführten „clean-ups“ auf die Wiederfindung (WDF) der Analyten im menschlichen Harn.	84
Abbildung 38:	Darstellung der Retentionszeitverschiebung einiger ausgewählter Analyten bei Injektion eines Harn-Extrakts. Vergleich der Retentionszeiten in ohne und mit Harn-Extrakt.	85
Abbildung 39:	Ergebnisse zur Überprüfung der Elutionskraft einiger ausgewählter Elutionsmittel die ionischen Analyten von der Reinigungskartusche zu entfernen.	86
Abbildung 40:	Darstellung der Kalibrationskurve einiger ausgewählter RKM.....	92
Abbildung 41:	Ergebnisse der Untersuchung von Röntgenkontrastmittel in der Ruhr (Mülheim). Zum Vergleich ist der Pegelstand der Ruhr ebenfalls eingezeichnet [33].	96
Abbildung 42:	Ergebnisse der Untersuchung von Röntgenkontrastmittel im Rhein (Düsseldorf). Zum Vergleich ist der Pegelstand des Rheins ebenfalls eingezeichnet [33].	97
Abbildung 43:	Ergebnisse der Untersuchung von Röntgenkontrastmittel im Rhein (Rees). Zum Vergleich ist der Pegelstand des Rheins ebenfalls eingezeichnet [33].	98
Abbildung 44:	Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse aus eigenen Untersuchungen, sowie Werte aus der BLAC-Studie.....	99
Abbildung 45:	Ergebnisse der Untersuchung von Röntgenkontrastmittel in der Grundwassermessstelle GWM 1 (44 m entfernt vom Rhein). Zum Vergleich ist der Pegelstand des Rheins ebenfalls eingezeichnet [33].	101
Abbildung 46:	Ergebnisse der Untersuchung von Röntgenkontrastmittel in der Grundwassermessstelle 2 (480 m entfernt vom Rhein). Zum Vergleich ist der Pegelstand des Rheins ebenfalls eingezeichnet [33].	102
Abbildung 47:	Graphische Darstellung der absoluten Arzneistofffrachten der Sickerwässer der Bodensäule gefüllt mit „Uedorfer Boden“ und das Ergebnis des Tracerversuchs.....	103
Abbildung 48:	Graphische Darstellung der absoluten Arzneistofffrachten der Sickerwässer der Bodensäule gefüllt mit „Meckenheimer Boden“ und das Ergebnis des Tracerversuchs.....	104

Abbildung 49: Graphische Darstellung der Ausscheidung des applizierten Röntgenkontrastmittel Iopromid über den menschlichen Harn (Applikation 10:00 Uhr).....	105
---	-----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Die 50 % Mortalität (LD ₅₀) einiger Röntgenkontrastmittel.....	4
Tabelle 2:	In dieser Arbeit ausgewählte iodierte Röntgenkontrastmittel	5
Tabelle 3:	Zusammenfassung einiger Harninhaltsstoffe. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf den 24-Stunden-Harn.	7
Tabelle 4:	Einteilung der unterschiedlichen flüssigchromatographischen Methoden	9
Tabelle 5:	Einwaagen der RKM zur Herstellung der Stammlösungen (ST1 + ST2).	23
Tabelle 6:	Tabellarische Zusammenfassung der eingesetzten HPLC-Säulen mit den dazugehörigen Eigenschaften.	25
Tabelle 7:	Ansatz der Bezugslösungen zu den Versuchen zum Injektionsvolumen.	26
Tabelle 8:	Konzentration der Einzellösungen zur Untersuchung möglicher Matrixeinflüsse durch Harn-Inhaltsstoffe.	28
Tabelle 9:	Ansatz und Zusammensetzung des synthetischen Harns.....	29
Tabelle 10:	Zusammenfassung der in dieser Arbeit untersuchten Festphasen.	30
Tabelle 11:	Zusammenfassung der in dieser Arbeit untersuchten Festphasen für die Durchführung des „clean-ups“ der Harn-Extrakte	33
Tabelle 12:	Ansatzschema und Konzentration der RKM-Bezugslösung aus der Zwischenverdünnung (ZV) zur Validierung des Verfahrens mittels Direktinjektion	34
Tabelle 13:	Ansatzschema und Konzentration der RKM-Bezugslösungen aus der Zwischenverdünnung (ZV) zur Validierung des Verfahrens (Festphasenextraktion Trinkwasser und Oberflächenwasser), Konzentration der Wasserproben.....	35
Tabelle 14:	Ansatzschema und Konzentration der RKM-Bezugslösungen aus der Stammlösung 1 zur Validierung des Verfahrens Direktinjektion (Harn)	36
Tabelle 15:	Ansatzschema und Konzentration der RKM-Bezugslösungen aus der Zwischenverdünnung 2 (ZV2) zur Validierung des Verfahrens (Festphasenextraktion Harn), Konzentration der Harnproben	37
Tabelle 16:	Bodencharakterisierung des Uedorfer Bodens.....	40
Tabelle 17:	Bodencharakterisierung des Meckenheimer Bodens	40
Tabelle 18:	Zusammenfassung der optimierten MS-Parameter der betrachteten Kontrastmittel bei Ionisierung im positiven ESI-Modus. Neben einigen elektrischen Parametern wurden auch die Flussraten von Sheath und Aux Gas sowie die Temperatur der beheizten Kapillare aufgezählt. ...	43

Tabelle 19:	Zusammenfassung der Ergebnisse zum Studium des Ionisierungs- und	47
Tabelle 20:	Zusammenfassung der Ergebnisse zum Studium des Fragmentierungs- verhalten der einzelnen RKM der 2. Generation.	52
Tabelle 21:	MS-Parameter für die Bestimmung der Röntgenkontrastmittel der zwei eingesetzten Tunefiles.....	53
Tabelle 22:	Retentionszeit (RT) in Minuten der untersuchten RKM mittels HPLC-MS in Abhängigkeit von der verwendeten Trennsäule und Laufmittelzu- sammensetzung	54
Tabelle 23:	Tabellarische Darstellung des optimierten Gradienten für die Trennung der iodierten Röntgenkontrastmittel.....	55
Tabelle 24:	Ergebnisse zum Studium unterschiedlicher SPE-Kartuschen auf deren Tauglichkeit iodierte RKM anzureichern.	75
Tabelle 25:	Ergebnisse zum Studium des Durchbruchs unterschiedlicher SPE- Kartuschen.	76
Tabelle 26:	Untersuchungsergebnisse zum Einfluss des pH-Wertes auf die Wiederfindungsrate nach Festphasenextraktion.	77
Tabelle 27:	Ergebnisse zur Optimierung der Extraktionsgeschwindigkeit zur Anreicherung der Analyten aus der Wasserprobe.....	78
Tabelle 28:	Zusammenfassung der Verfahrenskenndaten zur Analytik der ausgewählten Röntgenkontrastmittel in Trinkwasser (Direktmessung) nach DIN 38 402.....	89
Tabelle 29:	Zusammenfassung der Verfahrenskenndaten zur Analytik der ausgewählten Röntgenkontrastmittel in Trinkwasser mittels Festphasenextraktion.	90
Tabelle 30:	Zusammenfassung der Verfahrenskenndaten zur Analytik der ausgewählten Röntgenkontrastmittel in Oberflächenwasser mittels Festphasenextraktion.	91
Tabelle 31:	Zusammenfassung der ermittelten Verfahrenskenndaten zur Analytik der ausgewählten RKM in Harn ohne Probenaufarbeitung (1/100 verd.).	93
Tabelle 32:	Zusammenfassung der ermittelten Verfahrenskenndaten zur Analytik der ausgewählten RKM in Harn mit Probenaufarbeitung.....	93
Tabelle 33:	Ergebnisse zur Bestimmung des SOLL/IST-Wertes für die Bestimmung der ausgesuchten RKM in Trinkwasser, Oberflächenwasser und Harn.	95
Tabelle 34:	Zusammenfassung der gemittelten Konzentrationen und die daraus berechnete jährliche Fracht jedes einzelnen RKM in der Ruhr und im Rhein.	100

Abkürzungsverzeichnis

AOX	Adsorbierbare organische Halogenverbindungen
API	Atmospheric pressure ionisation
BZ	Bezugslösung
ESI	Electrospray Ionisation-Interface
FWHM	Full width at half maximum
GC	Gas chromatography
GWM	Grundwassermessstelle
HPLC	High performance liquid chromatography
HLB	Hydrophilic lipophilic based
IC	Ionenchromatographie
LC	Liquid chromatography
LD ₅₀	Letale Dosis bei der 50 % der Tiere verenden
MS	Massenspektrometrie
RKM	Röntgenkontrastmittel
RT	Retentionszeit
RP	Reversed phase
SDB	Styrol-Divinyl Benzol
SIM	Selected ion monitoring
SPE	Solid phase extraction
SRM	Selected reacted monitoring
ST	Stammlösung
TIC	Total-Ionenstrom Chromatogramm
WDF	Wiederfindung
ZV	Zwischenverdünnung

1 Einleitung

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Arzneistoffen im Oberflächenwasser, im Grundwasser und sogar im Trinkwasser festgestellt. Die ersten Nachweise von Clofibrinsäure (Metabolit eines Arzneistoffes) in Deutschland wurde in einem Oberflächengewässer in Berlin Anfang der 1990er Jahre erbracht [1]. Seither wird vermehrt nach Vertretern der Arzneimittel in der Umwelt gesucht und auch gefunden [2,3,4,5]. Die Arzneistoffe aus dem Bereich der Humanmedizin gelangen nach ihrer Anwendung über menschliche Ausscheidungen unzersetzt bzw. metabolisiert in das häusliche Abwasser und dann in die Kläranlagen. Von den Kläranlagen können diese Wirkstoffe bei unvollständiger Elimination in die Gewässer eingetragen werden. Das Ziel, den Eintrag von Arzneimitteln in den ökologischen Kreislauf zu vermindern oder ganz zu unterbinden, ist deswegen schwierig zu erreichen, da einerseits die Mengen an verordneten Medikamenten in den nächsten Jahren eher weiter steigen werden und zum anderen nur ein Teil der Dosis des jeweiligen Arzneistoffs vom Organismus resorbiert wird. Der Rest (ggf. mehr als 50 %, in Einzelfällen bei Diagnostika bis nahezu 100 %) wird ungenutzt wieder ausgeschieden. Hinzu kommt die Problematik der zum Teil unvollständigen Abbaubarkeit verschiedener Stoffe in kommunalen Kläranlagen. Aufgrund der Tatsache, dass Arzneimittelrückstände regelmäßig in Kläranlagenabläufen, in Fließgewässern und sogar im Grundwasser nachweisbar sind, werden verschiedene Pharmaka daher als umweltrelevante Stoffe mit einem hohen Verbreitungsgrad angesehen.

Die ökotoxikologische Gefährdung der Arzneistoffe ist bis heute umstritten. Die in Oberflächenwasser und Grundwasser gefundenen Konzentrationen liegen weit unterhalb ihrer therapeutisch verordneten Dosis. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass eine Exposition über einen längeren Zeitraum negative Auswirkungen auf Mikroorganismen, Tiere oder Menschen verursachen können. Es wird zum Beispiel der Einfluss des Antibiotikaeintrags auf die Zunahme antibiotikaresistenter Bakterien im Oberflächenwasser diskutiert [6]. Andere Studien zeigen, dass Arzneistoffe unter natürlichen Bedingungen Umwandlungs-, Abbau- und Reaktionsprodukte (Metabolite) bilden können [7,8,9]. Inwieweit die gebildeten Metaboliten ein ökotoxikologisches Risiko darstellen, bleibt ungeklärt.

Vor dem Fund der Clofibrinsäure, einem Metabolit der drei Lipidsenker Clofibrat, Etofibrat und Etofyllinibrat, waren organische Verunreinigungen wie die Pflanzenschutzmittel im Blickpunkt der Umweltanalytik. Bei einem hohem Vorkommen und starken ökotoxikologischen Auswirkungen auf die Umwelt wurde der betreffende Verursacher (z.B. Atrazin, Diuron) in der Anwendung einfach verboten oder eingeschränkt. Die Verfahrensweise des Verbotsausspruchs für den Gebrauch in der

Medizin ist nicht immer durchführbar, da in den meisten Fällen keine Ersatzarznei zur Verfügung steht.

Vor diesem Hintergrund ist es notwendig das Vorkommen, den Verbleib und den Transport solcher Arzneistoffe in der aquatischen Umwelt zu beobachten, damit mögliche Langzeiteffekte für Mensch, Tier und Umwelt erkannt, vorhergesagt und gegebenenfalls vermieden werden können. Zur Durchführung dieses Vorhabens sind Analysenverfahren für matrixarme und stark matrixbehaftete Proben unabdingbar.

2 Arzneimittel

Definitionsgemäß sind Arzneimittel Stoffe und Zubereitungen aus Stoffen, die dazu bestimmt sind, durch Anwendung am oder im menschlichen oder tierischen Körper

1. Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder krankhafte Beschwerden zu heilen, zu lindern, zu verhüten oder zu erkennen,
2. die Beschaffenheit, den Zustand oder die Funktionen des Körpers oder seelische Zustände erkennen zu lassen,
3. vom menschlichen oder tierischen Körper erzeugte Wirkstoffe oder Körperflüssigkeiten zu ersetzen,
4. Krankheitserreger, Parasiten oder körperfremde Stoffe abzuwehren, zu beseitigen oder unschädlich zu machen oder
5. die Beschaffenheit, den Zustand oder die Funktionen des Körpers oder seelische Zustände zu beeinflussen [10].

2.1 Röntgenkontrastmittel

Der Fokus dieser Arbeit wurde auf iodierter Röntgenkontrastmittel gerichtet. Iodierte Röntgenkontrastmittel sind in den letzten Jahren verstärkt zu einem Problem der Wasserversorger geworden, die ihr Trinkwasser aus Uferfiltrat oder aus der stehenden Welle gewinnen. Die genannten Stoffe zeigen sehr hohe Konzentrationen in den zur Trinkwassergewinnung verwendeten Oberflächenwässern. Hinzu kommt, dass sie wegen ihrer schlechten mikrobiellen Abbaubarkeit und geringen sorptiven Eigenschaften während einer Uferpassage oder Langsandsandfiltration nur geringfügig eliminiert werden können. Die hohe Polarität der Diagnostika erschwert zudem eine effektive Entfernung mittels Aktivkohlefiltration.

Röntgenkontrastmittel (RKM) sind Hilfsmittel in der Radiologie. Sie werden in der Röntgendiagnostik, Computer Tomographie und bei der Ultraschalldiagnostik eingesetzt. Durch den Einsatz der Arzneimittel ist es möglich Organe und Gefäße gezielt darzustellen [11]. Weltweit werden jährlich etwa 3500 Tonnen verwendet. Dabei entfallen etwa 500 T auf Deutschland [12,13]. Mit ca. 90 % ist der Anteil der nicht-ionischen RKM am größten. Zu den wichtigsten Vertretern dieser Klasse zählen die Stoffe Iopromid, Iohexol, Iomeprol, Iopamidol, Iopentol und Ioversol. Allein Iopromid ist mit einem Mengenanteil von über 30 % bezogen auf den Marktanteil nicht-ionischer RKM vertreten. Ionischen RKM wie Amidotrizoesäure und Iothalamidsäure besitzen nur einen geringen Marktanteil. Die Basis sämtlicher Röntgenkontrastmittel stellt das 2,4,6-Triiodbenzol (Abbildung 1) dar.

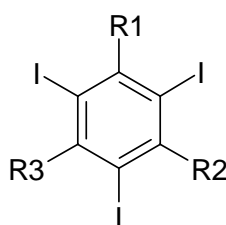


Abbildung 1: Grundstruktur triiodierter Röntgenkontrastmittel

Iodierte Röntgenkontrastmittel können entsprechend ihrer chemischen Struktur in vier Gruppen eingeteilt werden. Dazu zählen die ionischen Monomeren, die nicht ionischen Monomeren, die ionische Dimere sowie nicht ionischen Dimere. Ionische Röntgenkontrastmittel verursachen aufgrund ihrer elektrischen Ladung Interaktionen mit dem Organismus. Daher kommt es bei den ionischen RKM wesentlich häufiger zu schweren Nebenwirkungen als bei den nicht-ionischen Vertretern. Ionische RKM werden nur dann eingesetzt, wenn nicht-ionische RKM aufgrund ihrer zu geringen elektrischen Ladung für ihren gedachten Einsatz ungeeignet sind. Wie zum Beispiel bei der Darstellung des Gallengangsystems [11].

Das in Abbildung 1 dargestellte Grundgerüst vereinigt drei für den medizinischen Einsatz relevante Vorteile. Es besitzt eine hohe Kontrastdichte, das Element Jod ist fest an das vielfältig variierbare Benzolmolekül gebunden, und es weist nur eine geringe Molekültoxizität auf. Starken Einfluss auf die Molekültoxizität haben die Molekülpositionen 1, 3 und 5. Durch das Einführen von aliphatischen Seitenketten in Position 2, 4 und 6 kann man die physikochemischen und biologischen Eigenschaften in vielfältiger Weise beeinflussen [14]. Die Molekültoxizität ergibt sich aus dem räumlichen Aufbau des Moleküls und dessen Eigenschaft, sich an Proteine und andere Moleküle zu binden. Die 50 % Mortalität (LD_{50}) der Röntgenkontrastmittel liegt zwischen 9-41 g Iod/kg Maus. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über LD_{50} -Werte einiger Röntgenkontrastmittel.

Tabelle 1: Die 50 % Mortalität (LD₅₀) einiger Röntgenkontrastmittel

Röntgenkontrast- mittel	Substanzklasse	LD ₅₀ Wert ¹⁾ [g Iod/kg Maus]	Literatur
Amidotrizoesäure	ionisches Monomer	9	[2]
Iohexol	nicht-ionisches Monomer	24	[2]
Iomeprol	nicht-ionisches Monomer	41	[15]
Iopromid	nicht-ionisches Monomer	17	[2]
Iopamidol	nicht-ionisches Monomer	22	[2]
Iopentol	nicht-ionisches Monomer	19	[2]
Iodixanol	nicht-ionisches Dimer	21	[2]

¹⁾ LD₅₀ = Dosis bei der 50% der Versuchstiere verenden (lethal dose)

Die toxikologische Gefährdung durch die iodierten Stoffe ist bis heute umstritten. Hersteller beschreiben ihre Stoffe als ökotoxikologisch unbedenklich [16]. Studien hingegen zeigen, dass iodierte Röntgenkontrastmittel unter natürlichen Bedingungen Metabolite bilden. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass aus der Amidotrizoesäure durch Demethylierung das freie Amin entsteht. Iopromid lieferte neben anderen Metaboliten ebenfalls ein freies Amin [8,17]. Inwieweit die gebildeten Metaboliten ein ökotoxikologisches Risiko darstellen, bleibt ungeklärt. Die Verwaltungsvorschrift wassergefährdender Stoffe (VwVwS) von 1999 teilt Stoffe aufgrund ihrer Gefährlichkeit in drei Wassergefährdungsklassen ein. In dieser Vorschrift wurden die drei Röntgenkontrastmittel Iohexol, Iopentol und Iodixanol der Gefährdungsklasse 1 „schwach wassergefährdend“ zugeordnet [18].

Röntgenkontrastmittel werden mitunter in Dosen von 90 bis zu 1200 mg/kg Körpergewicht in Kliniken und Röntgenpraxen eingesetzt [13]. Nach bestimmungsgemäßem Gebrauch werden die iodhaltigen Diagnostika renal durch glomeruläre Filtration nicht metabolisiert wieder ausgeschieden. Die Ausscheidungsraten können in den ersten 24 h bis zu 98 % betragen.

Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Röntgenkontrastmittel wurde mit Hilfe einer eingehenden Literaturrecherche getroffen. Dabei sind die Stoffe, die in der Literatur als relevant erachtet wurden, in die Untersuchungen mit einbezogen worden. Um ein umfangreiches Spektrum zu garantieren, sollten zusätzlich noch weitere Vertreter hinzukommen. Die elf ausgewählten Röntgenkontrastmittel decken drei der vier vorkommenden Substanzklassen ab. Neben zwei Vertretern der ionischen Monomeren werden acht der nicht-ionischen Monomere mit in die Untersuchungen einbezogen. Als Vertreter der Dimere wurde ein nicht-ionisches Dimer

untersucht. In der folgenden Tabelle sind alle elf iodierten RKM aufgelistet. Neben der Einteilung in die Substanzklassen gibt die Tabelle Information über CAS-Nummer und Summenformel. Die Abbildung 2 zeigt die chemischen Strukturformeln der eingesetzten Röntgenkontrastmittel.

Tabelle 2: In dieser Arbeit ausgewählte iodierte Röntgenkontrastmittel

Substanz	Substanz-Klasse	CAS-Nr.	Summenformel
Amidotrizoesäure	ionisches Monomer	117-96-4	$C_{11}H_9I_3N_2O_4$
Iothalamidsäure	ionisches Monomer	2276-90-6	$C_{11}H_9I_3N_2O_4$
Iobitridol	nicht-ionisches Monomer	136949-58-1	$C_{20}H_{28}I_3N_3O_9$
Iohexol	nicht-ionisches Monomer	66108-95-0	$C_{19}H_{26}I_3N_3O_9$
Iomeprol	nicht-ionisches Monomer	78649-41-9	$C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$
Iosarkol	nicht-ionisches Monomer	97702-82-4	$C_{21}H_{29}I_3N_4O_9$
Iopromid	nicht-ionisches Monomer	73334-07-3	$C_{18}H_{24}I_3N_3O_8$
Ioversol	nicht-ionisches Monomer	87771-40-2	$C_{18}H_{24}I_3N_3O_9$
Iopamidol	nicht-ionisches Monomer	60166-93-0	$C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$
Iopentol	nicht-ionisches Monomer	89797-00-2	$C_{20}H_{28}I_3N_3O_9$
Iodixanol	nicht-ionisches Dimer	92339-11-2	$C_{35}H_{44}I_6N_6O_{15}$

Ionische monomere Röntgenkontrastmittel		
<p>Amidotrizoesäure</p>	<p>Iothalamicsäure</p>	
Nicht-Ionische monomere Röntgenkontrastmittel		
<p>Iobitridol</p>	<p>Iohexol</p>	<p>Iomeprol</p>
<p>Iosarkol</p>	<p>Iopromid</p>	<p>Ioversol</p>
<p>Iopamidol</p>	<p>Iopentol</p>	
Nicht-Ionisches dimeres Röntgenkontrastmittel		
<p>Iodixanol</p>		

Abbildung 2: Chemische Strukturformeln der elf in dieser Arbeit untersuchten iodierten Röntgenkontrastmittel

3 Harn

In dieser Arbeit sollen Verfahren zur Bestimmung iodierter Röntgenkontrastmittel in verschiedenen wässrigen Matrices entwickelt werden. Als Vertreter matrixreicher Proben wurde der menschliche Harn ausgewählt. Er enthält anorganische Salze in hohen Konzentrationen, sowie eine Vielzahl von organischen Substanzen. Ein ausgewachsener Mensch produziert täglich etwa 1 bis 1,5 Liter Harn. Der Harn ist ein Ausscheidungsprodukt, das in den Nieren produziert wird. Über den Harn wird der Flüssigkeitshaushalt reguliert und Stoffwechselprodukte ausgeschieden. Die Gehalte an Harn-Inhaltsstoffen unterliegen physiologischen Schwankungen. Einige Substanzen werden in tagesperiodisch wechselnden Konzentrationen ausgeschieden, so dass sich genauere Angaben über die Zusammensetzung des Harns stets auf den 24 Stunden-Harn beziehen. Neben Harnstoff, einem Endprodukt des Eiweißstoffwechsels, liegen auch weitere organische Substanzen wie Harnsäure, Kreatinin, Citronensäure und Aminosäuren vor. Kreatinin ist ein Endprodukt des Muskelstoffwechsels. Seine Farbe erhält der Harn vom Urobilin, welches eine orangegelbe Farbe aufweist und aus dem Gallenfarbstoff Bilirubin gebildet wird. Neben zahlreichen organischen Substanzen enthält der Harn auch eine Vielzahl anorganischer Salze. Die im Harn gelösten Substanzen sind in der Tabelle 3 aufgelistet. Der pH-Wert des frischen Harns liegt bei 5 bis 6,4. Die Dichte liegt zwischen 1,001 - 1,035 [19].

Tabelle 3: Zusammenfassung einiger Harninhaltsstoffe. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf den 24-Stunden-Harn.

		Inhaltsstoff	24-Stunden-Harn [g/l]
Organische Substanzen		Harnstoff	20,00
		Aminosäuren	2,00
		Kreatinin	1,50
		Harnsäure	0,50
		Citronensäure	0,50
		Gesamtprotein	0,15
		Urobilin	k.A.
Anorganische Substanzen	Kationen	Natrium	5,90
		Kalium	2,70
		Ammonium	0,80
		Calcium	0,50
		Magnesium	0,40
	Anionen	Chlorid	8,90
		Phosphat	4,10
		Sulfat	2,40

k.A.: keine Angabe

4 Stand der Analytik

In der Spurenanalytik anthropogener organischer Stoffe kommt heutzutage eine Vielzahl von Verfahren mit zum Teil erheblichen instrumentellen Aufwand zum Einsatz. Um eine Trennung zwischen chemisch sehr ähnlichen Verbindungen aus komplexen Matrices durchführen zu können, werden neben der Gaschromatographie (GC), die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) aber auch die Ionenchromatographie (IC) eingesetzt. Für die Detektion steht eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Gaschromatographische Methoden mit unterschiedlichen Detektionsarten wie Flammenionisationsdetektoren, Stickstoff/Phosphordetektoren aber auch Elektroneneinfangdetektoren sind inzwischen weit verbreitet. Die Ionenaustauschchromatographie verwendet meist einen Leitfähigkeitsdetektor. In der Hochleistungsflüssigchromatographie kommen meist Diodenarray-Detektoren zum Einsatz. Substanzen, die zur gleichen Zeit eluieren, können heutzutage mit massenspektrometrischen Detektoren simultan selektiv quantifiziert werden. Massenspektrometrische Detektoren sind sowohl für die GC als auch für die HPLC einsetzbar.

Die Ionenaustauschchromatographie ist eine moderne und effiziente Methode zur Trennung und Bestimmung von Ionen an Ionenaustauscherharzen. Sie wird zwar auf eine Vielzahl organischer und biochemischer Systeme angewandt, jedoch vermehrt zur Trennung hochmolekularer Verbindungen wie zum Beispiel Vitamine und Zucker-Präparate herangezogen. Die Gaschromatographie besitzt gegenüber der Ionenaustauschchromatographie und Hochleistungsflüssigchromatographie den Vorteil einer höheren Trennschärfe, die insbesondere bei komplexen Stoffgemischen eine höhere Sicherheit bietet. Allerdings basiert die Technik auf der Leichtflüchtigkeit der Analyten. Zusätzlich erfordert die Gaschromatographie in den meisten Fällen eine Derivatisierung der polaren funktionellen Gruppen, was mit erheblichem Mehraufwand verbunden ist. Die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen weisen viele polare funktionelle Gruppen auf, was eine Derivatisierung bei Verwendung der Gaschromatographie unumgänglich macht. Zudem sind die betrachteten Stoffe schwerflüchtig. Die Schmelztemperatur (und zugleich auch Zersetzungstemperatur) liegt für Iopromid bei 295 °C. Nur zwei der in dieser Arbeit betrachteten RKM liegen in ionischer Form vor, sodass auch eine Ionenchromatographie nur bedingt geeignet wäre. Die Hochleistungsflüssigchromatographie ist somit die Analysentechnik, die für die Bestimmung der iodierten Röntgenkontrastmittel am besten geeignet zu sein scheint. Zur Detektion der Analyten wird ein Massenspektrometer verwendet. Dies ermöglicht eine empfindliche simultane Detektion der sehr ähnlichen und zum Teil koeluierenden Stoffe.

In Abhängigkeit von dem zu untersuchenden Parameter und der ausgewählten Analysentechnik muss die Probe gegebenenfalls vorbereitet werden. Trotz chroma-

tographischer Verfahren mit hochsensiblen Detektoren müssen die Substanzen in den meisten Fällen aufkonzentriert werden, um eine niedrigere Bestimmungsgrenze erzielen zu können. Zusätzlich muss eine Probe vor der eigentlichen Analyse aufgereinigt werden, um störende Komponenten zu eliminieren. Zu den Probenvorbereitungstechniken zählt die Extraktion der Analyten mit einem organischen Lösungsmittel (Flüssig-Flüssig-Extraktion) oder mittels der so genannten Festphasen-Extraktion (SPE).

4.1 HPLC-MS

Die Hochleistungsflüssigchromatographie nutzt eine flüssige mobile Phase zum Transport der Analyten. Als stationäre Phase können je nach Anwendung verschiedene Materialien eingesetzt werden. In der folgenden Tabelle 4 sind die Untergruppen der Flüssigchromatographie, nach ihrer Anwendung unterschieden, aufgelistet.

Tabelle 4: Einteilung der unterschiedlichen flüssigchromatographischen Methoden [20].

Methoden	Stationäre Phase	Zugrunde liegende Gleichgewichtsreaktion
Flüssig-flüssig Chromatographie	Flüssigkeit, adsorbiert an einem Feststoff	<i>Verteilung</i> zwischen zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten
Flüssigchromatographie an chemisch gebundenen Phasen	Organische Spezies an Feststoffoberfläche chemisch gebunden	<i>Verteilung</i> zwischen der Flüssigkeit und der chemisch gebundenen Phase
Flüssig-fest- oder Adsorptionschromatographie	Feststoff	<i>Adsorption</i>
Ionenaustauschchromatographie	Ionenaustauschharz	<i>Ionenaustausch</i>
Gelpermeations- oder Ausschlusschromatographie	Flüssigkeit in den Zwischenräumen eines polymeren Feststoffes	<i>Molekularsiebeffekt</i>

Von den vier eingesetzten Methoden, Verteilung, Adsorption, Ionenaustausch und Molekularsieb, ist die Verteilungschromatographie das am häufigsten eingesetzte Verfahren. Wie die Tabelle 4 zeigt, kann die Verteilungschromatographie in Flüssig-Flüssig-Chromatographie und in Chromatographie an chemisch gebundener Phase unterteilt werden. Sie unterscheiden sich lediglich in der Art, wie die stationäre Phase auf den Teilchen des Packungsmaterials festgehalten wird. Der Trennvorgang

basiert auf die Verteilung des Analyten zwischen zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten oder zwischen einer Flüssigkeit und einer chemisch gebundenen Phase.

Als Trägermaterial, der am häufigsten eingesetzten Säulen, werden festes Kieselgel oder Kieselgelabkömmlinge verwendet. In der folgenden Abbildung 3 ist die Oberfläche von vollständig hydrolisiertem Kieselgel dargestellt. Sie besteht aus chemisch reaktiven SiOH-Gruppen.

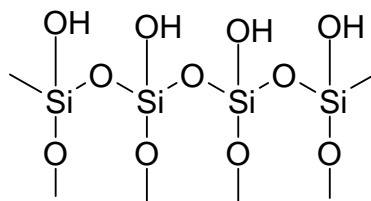


Abbildung 3: Darstellung einer vollständig hydrolisierten Kieselgel-Oberfläche.

An den sehr reaktiven SiOH-Gruppen können Organochlorsilane chemisch gebunden werden, wobei Siloxane entstehen. Die Abbildung 4 zeigt eine solche Reaktion. Als Rest R im Organochlorsilanmolekül können je nach gewünschter Polarität unterschiedlichste Alkylgruppen fungieren. Solche hergestellten Systeme werden in Säulen gepackt und finden so in der Praxis ihre Anwendung.

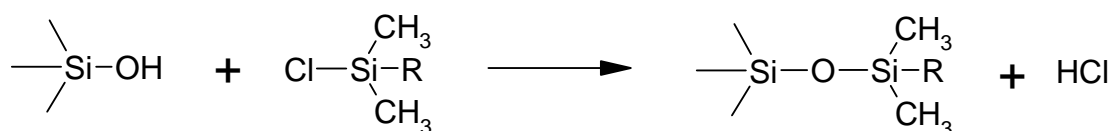


Abbildung 4: Reaktion zwischen einer Si-OH-Gruppe und einem Organochlorsilan.

Bei der Verteilungschromatographie kann man bezogen auf die Polaritäten der mobilen und stationären Phase zwei Typen unterscheiden, die Normalphasenchromatographie sowie die Umkehrphasenchromatographie oder RP-Chromatographie (reversed phase). Bei der Normalphasenchromatographie ist die mobile Phase unpolar und die stationäre Phase polar. Im Gegensatz dazu ist bei der RP-Chromatographie die stationäre Phase unpolar und die mobile Phase polar. In kommerziellen HPLC-Säulen handelt es sich um Siloxane, bei dem der Rest R eine C8-(n-Octyl) oder C18-(n-Octadecyl) Kette ist.

In der Massenspektrometrie (MS) werden die zu analysierenden Komponenten in ionisierte Moleküle überführt und an Hand ihres Masse/Ladungsverhältnisses (m/z)

detektiert. Ein MS-Gerät besteht prinzipiell aus einem Einlasssystem, einer Ionenquelle mit einem System zur Beschleunigung der Ionen, dem Trenn- oder Analysatorsystem und einem Detektor mit der Registrier- und Auswerteeinrichtung. Zusätzlich muss das Ionenfallen-Massenspektrometer evakuiert werden, um unerwünschte Kollisionen der Analytione mit Fremdspezies möglichst gering zu halten (Abbildung 5). In der Ionenquelle des Massenspektrometers werden die Moleküle in Ionen umgewandelt. Dies kann durch Beschuss mit Elektronen, Ionen, Molekülen oder Photonen durchgeführt werden. Alternativ kann die Ionisierung durch thermische oder elektrische Energie erfolgen. Um die vorhandenen Ionen anhand ihres Masse/Ladungsverhältnisses detektieren zu können, benötigt man einen Massenanalysator. Neben dem Magnetfeld-Sektorfeld-Analysator, dem Flugzeitmassenspektrometer und dem Quadrupol (oder Hexapol, oder Octapol) gibt es noch die so genannte Ionenfalle.

Beim Ionenfallen-Massenspektrometer, das in dieser Arbeit zum Einsatz kam, gelangen die ionischen Analyten über die geheizte Kapillare in das Hochvakuum des Massenspektrometers. Die zwei aufeinander folgenden Octapole dienen der Abtrennung unerwünschter neutraler oder entgegengesetzt geladener Moleküle. Nach Passieren des zweiten Octapols gelangen die Ionen in die Ionenfalle. Sie besteht aus zwei Endkappen mit einer dazwischen liegenden Ring-Elektrode. An dieser Ringelektrode liegt ein variables Hochfrequenzspannungsfeld an. Die Molekülionen, auch Precursorionen genannt, werden mit einer niedrigen Umlauffrequenz in der Ionenfalle festgehalten und mit Hilfe des Heliums zu einer Raumladungswolke konzentriert. Durch Änderung der Umlauffrequenz kann erreicht werden, dass die Umlaufbahnen einzelner Ionen in Abhängigkeit von ihrem Masse/Ladungsverhältnis instabil werden. Die instabilen Precursorionen werden aus der Falle heraus geschleudert und anschließend mittels Elektronenvervielfacher detektiert. Diese Vorgehensweise bezeichnet man als „full scan“.

Man hat auch die Möglichkeit im so genannten SIM (selected ion monitoring)- Modus zu messen. In diesem Modus wird das Hochfrequenzspannungsfeld so verändert, dass ein ausgewähltes Ion (oder auch mehrere) in der Falle zurückgehalten und anschließend wird. Dieses wird anschließend am Elektronenvervielfacher detektiert wird. Möchte man nun anstatt der Precursorionen dessen Fragmentationen vermessen, so behält die Falle wie oben beschrieben nur die Ionen eines ausgewählten Masse/Ladungsverhältnisses zurück. Diese werden dann mit Helium bombardiert, wodurch das Precursorion in einzelne Fragmente zerschlagen wird. Je nach Stärke der Kollisionsenergie treten mehr oder weniger Fragmentationen auf. Anschließend werden die entstandenen Ionen, wie oben beschrieben, detektiert. In der folgenden Abbildung 5 ist ein Ionenfallensystem schematisch dargestellt.

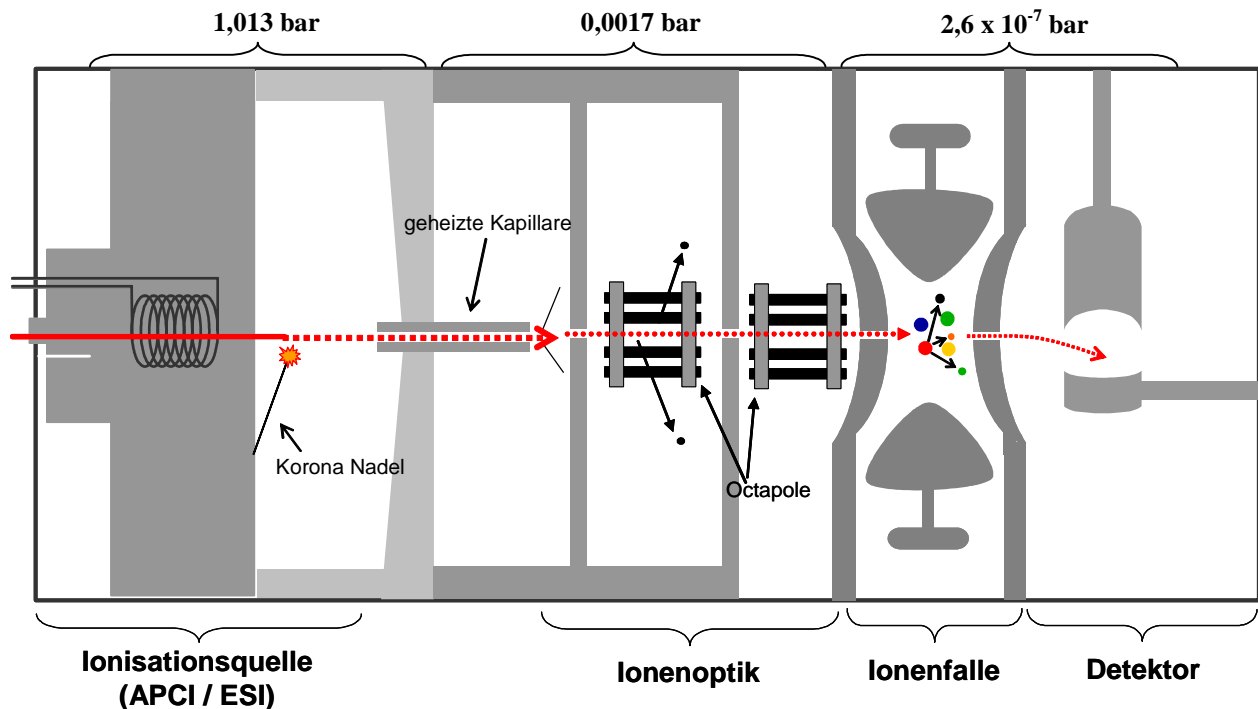


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Ionenfallen-Massenspektrometers mit APCI-(atmospheric pressure ionisation) Ionisationsquelle.

Wird das MS im Rahmen der Spurenanalytik als Detektor eines chromatographischen Systems verwendet, so wird der Ausgang der chromatographischen Säule in den Einlass des Massenspektrometers geführt. Die HPLC-MS-Kopplung entwickelte sich erst Anfang der 90er Jahre zu einer in der Praxis anwendbaren Technik. Das Hauptproblem bei der Kopplung der HPLC mit dem MS-Gerät war die Unverträglichkeit größerer Lösungsmittelvolumina aus der mobilen Phase mit dem Hochvakuum des Massenspektrometers. Diese anfänglichen Probleme sind heute allerdings zufrieden stellend mit Hilfe von schonenden LC-MS-Kopplungstechniken gelöst. Eine dieser Techniken ist die Atmosphärendruck-Ionisations (API)-Technik (atmospheric pressure ionisation). Dabei werden die Probenmoleküle in einem Interface in die Gasphase überführt und anschließend unter Atmosphärendruck ionisiert. Die Ionen gelangen dann über einen Skimmer in das Hochvakuum des Analysators, wo sie durch elektrische und magnetische Felder beschleunigt und anhand ihres Masse/Ladungsverhältnisses getrennt und mit einem Elektronenvervielfacher detektiert werden. Im nachfolgenden sind zwei Varianten der API-Quellen näher beschrieben, die in dieser Arbeit Anwendung fanden. Bei der ersten Variante (Abbildung 6) handelt es sich um die so genannte APCI- (atmospheric pressure chemical ionisation) Quelle.

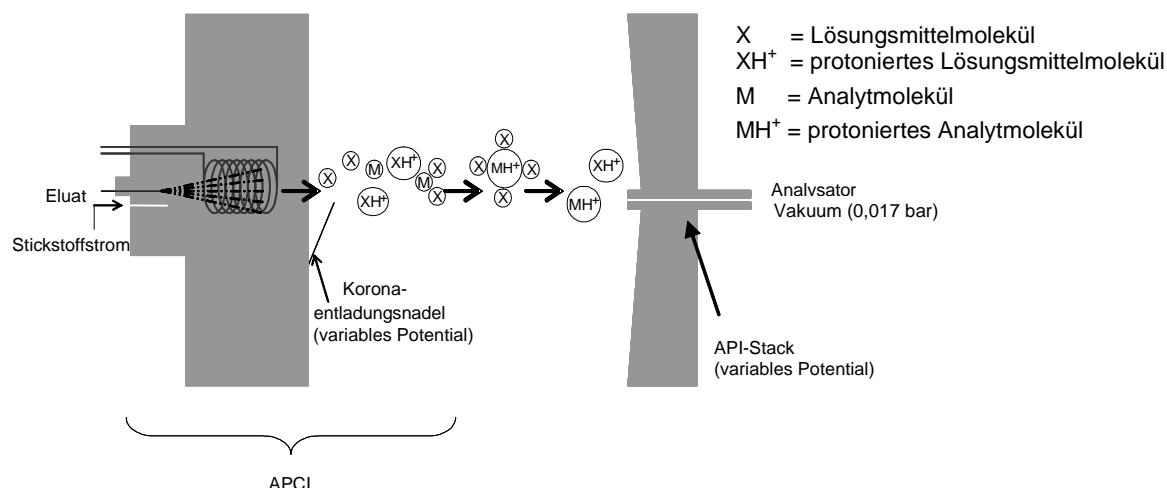


Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines APCI-Interfaces

Wie der Aufbau zeigt, gelangt das Eluat als erstes durch eine feine Kapillare, wo es am Ende mit Hilfe eines Stickstoffstroms zerstäubt wird. Die so fein zerstäubte Probe wird dann beim Durchströmen eines Heizers fast vollständig verdampft. Im Anschluss erfolgt die Ionisation mit Hilfe der Lösungsmittelmoleküle (X) als Reaktandionen (XH^+) an einer unter Spannung stehenden Koronaentladungsnadel. Je nach gewünschter Polarität reagieren die geladenen Reaktandionen (XH^+) mit dem Analyten (M) unter Protonierung (positiv-Modus) oder Deprotonierung (negativ-Modus). Danach erfolgt der Übergang in das Hochvakuum des Massenanalysators.

In der Abbildung 8 ist das ESI (Electrospray Ionisation-Interface) abgebildet. Im Gegensatz zur APCI-Quelle wird sie nicht beheizt. Die Überführung der Probenmoleküle in die Gasphase erfolgt mit Hilfe einer angelegten Spannung. Die Abbildung 7 veranschaulicht die in der ESI-Quelle stattfindenden Ionisierungsvorgänge.

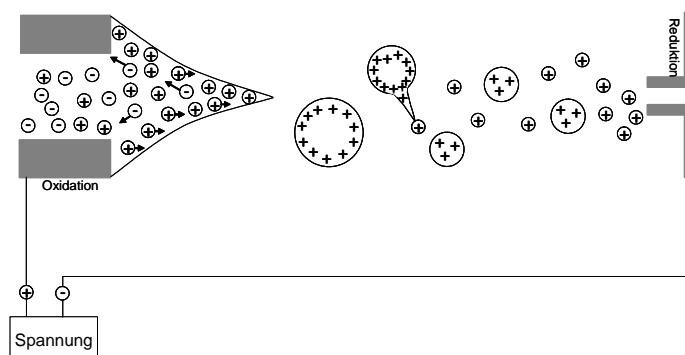


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Ionisierungsprozesses in der ESI-Quelle.

Auf das Eluat, das mit sehr geringen Flussraten aus einer metallischen Kapillare austritt, wirkt ein hohes elektrisches Potential. Eine metallische Oberfläche, die ein bis drei Zentimeter entfernt ist, bildet dabei den Gegenpol. In der ESI-MS Technik stellt der Gegenpol gleichzeitig den Einlass in das Hochvakuum des Massenspektrometers dar. Entgegengesetzt polarisierte Ionen des Eluats werden an der Kapillare entladen. Die Ionen gleicher Polarität bewegen sich zur Austrittsöffnung. Elektrohydrodynamische Prozesse an der Oberfläche führen zur Ausbildung eines Kegels, dem so genannten Taylor cone. Bei Anlegen eines starken elektrischen Feldes wird der Taylor cone instabil und es kommt zur Ablösung feiner Tröpfchen mit Durchmessern von nur wenigen Mikrometern. An der Oberfläche der Tropfen bildet sich, bedingt durch die dort vermehrt vorkommenden gleich geladenen Ionen, eine Überschussladung aus. Im Inneren befinden sich nur noch neutrale Moleküle und neutrale Salze. Die entstandenen Tröpfchen bewegen sich aufgrund von Potentialdifferenzen in Richtung der Interfaceplatte, wobei sie desolvatisieren und anschließend in die Gasphase übergehen. [21,22].

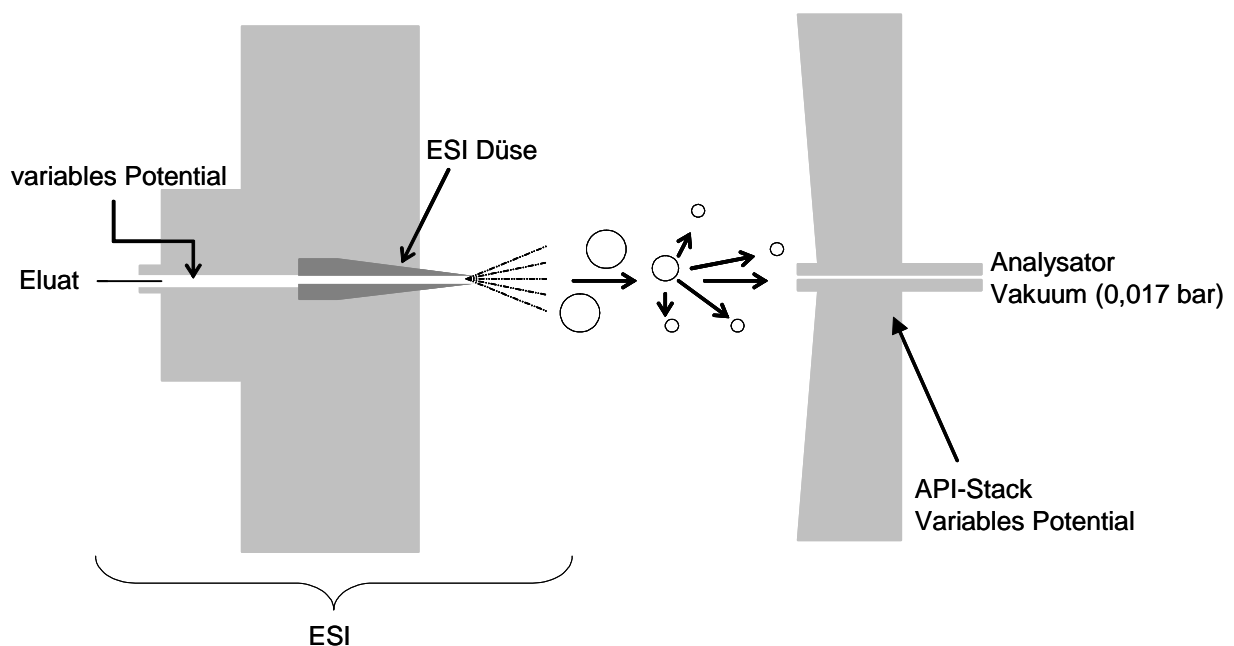


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines ESI-Interfaces

Da bei der ESI-Technik keine eigentliche Ionisation stattfindet, müssen die Ionen schon im Eluat vorliegen. Damit dies gewährleistet ist, werden entsprechende organische Elektrolyte zugesetzt, wie z.B. Essigsäure [23].

4.1.1 Matrixeffekte bei der massenspektrometrischen Detektion

Aufgrund der starken Unterschiede in den Ionisierungstechniken von APCI und ESI ist es nicht verwunderlich, dass beide Verfahren verschieden auf vorhandene Matrixbestandteile reagieren. Die APCI-Technik ist weniger anfällig für mögliche Matrixeffekte. Die Anfälligkeit der ESI-Technik kann hingegen sehr erheblich sein [24]. Man beobachtet eine Signalunterdrückung oder Signalverstärkung der Analyten. Ursache hierfür ist vermutlich die Konkurrenz zwischen dem Analyt und den Matrixbestandteilen um die nur begrenzt vorliegenden Oberflächenladungen der sich bildenden Tropfen. Die Ionen, die im Massenspektrum zu sehen sind, bilden an der Oberfläche der Tröpfchen die Überschussladung aus. Um eine exakte Quantifizierung durchführen zu können, müssen die Matrixeffekte eliminiert oder kompensiert werden. Erreichen kann man dies durch eine geeignete Probenvorbereitung, wie Festphasenextraktion, Flüssig/Flüssig-Extraktion oder durch verbesserte chromatographische Bedingungen. Ist allerdings keine der genannten Strategien geeignet Matrixeffekte zu eliminieren, müssen sie durch geeignete Kalibrierungsmethoden (z.B. Standardadditionsverfahren) kompensiert werden [25].

4.2 Aufarbeitungstechniken für wässrige Proben

Zur Erreichung der geforderten Bestimmungsgrenzen werden hohe Anforderungen an die Stoffisolierung gestellt. Zur Erfassung der organischen Substanzen in µg/l- bzw. ng/l- Bereich müssen die Wirkstoffe aus den Proben angereichert und aufkonzentriert werden. Für die Analytik solcher Mikrokomponenten stehen heute in der Wasseruntersuchung einige Möglichkeiten als Probenvorbereitungsschritte zur Verfügung. In dieser Arbeit kamen die Flüssig/Flüssig-Extraktion sowie die Festphasen-Extraktion zum Einsatz. Zusätzlich wurden Methoden zur Proteinfällung untersucht.

Flüssig/Flüssig-Extraktion

Die Flüssig/Flüssig-Extraktion war bis Mitte der achtziger Jahre die einzige Möglichkeit organische Stoffe aus Wasserproben zu extrahieren. Diese Arbeitstechnik ist jedoch sehr arbeitsaufwendig, nicht automatisierbar und verbraucht zudem große Mengen zum Teil toxischer Lösungsmittel. Es gibt allerdings einige organische Substanzen, vor allem aus der Reihe der sehr polaren Stoffe, die nur mittels Flüssig/Flüssig-Extraktion aus Wasserproben zu isolieren sind.

Festphasenextraktion

Unter Festphasenextraktion (Solid Phase Extraktion / SPE) versteht man die Extraktion der zu untersuchenden Substanz aus der flüssigen Matrix mit Hilfe eines festen Adsorbens. Sie wird heute vermehrt zum Herauslösen von Substanzen aus komplexen Gemischen eingesetzt. Nach Elution der Analyten mit nur geringen Volumina an Lösungsmitteln erzielt man zudem eine starke Aufkonzentrierung. Durch diese Vorgehensweise können Anreicherungsfaktoren bis zum 5.000 fachen erreicht werden. Die Wahl des Adsorbens ist abhängig von der Polarität des zu analysierenden Stoffes. Neben hochporösen Adsorberharzen auf der Basis von Polystyroldivinylbenzol ist das am meisten verwendete Material chemisch modifiziertes Kieselgel (siehe S. 10). Es wird vorzugsweise zum Extrahieren von unpolaren bis mittelpolaren Stoffen eingesetzt.

In der Praxis findet RP-C18- und RP-C8-Material Anwendung. Die Probenaufarbeitung mit Hilfe der Festphasenextraktion beinhaltet mehrere Einzelschritte, welche in Abbildung 9 dargestellt sind.

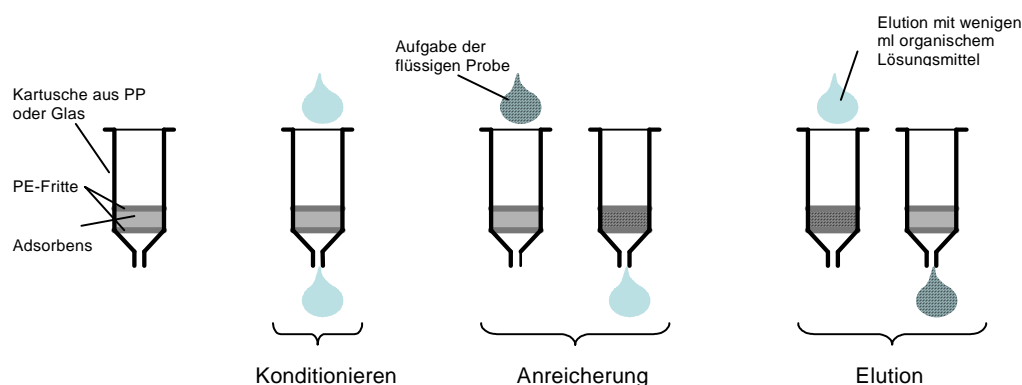


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Festphasenextraktion (SPE).

Dieser Vorgang dient der Reinigung und Vorbehandlung des verwendeten Adsorbens mit einem geeigneten Lösungsmittel, um eine ausreichende Wechselwirkung des Analyten mit den Kohlenwasserstoffketten zu gewährleisten. Nach der Konditionierung wird die Probe (z.B. 1 Liter des zu untersuchenden Wassers) aufgegeben. Bei diesem Vorgang werden die Analyten an der Festphase adsorbiert. In der Praxis geschieht dies meist mit Über- oder Unterdruck. Im Anschluss daran wird die Kartusche im Luft- oder Stickstoffstrom getrocknet. Nach vollständiger Trocknung wird der Analyt mit wenigen Millilitern eines geeigneten Lösungsmittels eluiert. Anschließend kann das Eluat einer Messung unterzogen werden.

Proteinfällung

Die Proteinfällung wird zur Vorreinigung von Proteinlösungen eingesetzt, um Kontaminationen zu entfernen, die bei einer späteren Proteinanalyse stören würden. Fällung von Proteinen tritt auf, wenn Monomere oder kleine Komplexe von gelöstem Protein sich zu großen Aggregaten zusammenschließen. Dies wird auch Präzipitation genannt. Wie leicht oder schwer Proteine gefällt werden können, hängt von der Löslichkeit der Stoffe im Lösungsmittel ab. Proteine bestehen aus polaren, apolaren und geladenen Aminosäuren. Die polaren und geladenen Gruppen an der Oberfläche der Proteine interagieren mit den Wassermolekülen unter Wasserstoffbrückenbildung. Dabei bildet sich eine Hydrathülle aus, die die Bildung von großen Aggregaten verhindert. Die meisten Proteine lassen sich durch anorganische Salze aus wässrigen Lösungen ausfällen. Durch Veränderung des pH-Wertes der Lösung lassen sich die Methoden noch verbessern. Eine Fällung von Proteinen aus wässriger Lösung ist jedoch auch durch mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel wie Alkohole oder Aceton möglich [26].

5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es Analysenverfahren zu entwickeln, um iodierter Röntgenkontrastmittel in matrixarmen und matrixreichen wässrigen Proben bestimmen zu können. Als Analysetechnik kommt die HPLC-MS zum Einsatz.

Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, ein größeres Parameter-Spektrum zu erzielen.

Zunächst soll ein Verfahren für matrixarme wässrige Proben für elf verschiedene Röntgenkontrastmittel entwickelt werden.

Im Anschluss daran soll dieses Verfahren auf matrixreiche Wasserproben übertragen und gegebenenfalls angepasst werden. Als Model für matrixreiche Wasserproben wird menschlicher Harn eingesetzt.

Im Vorfeld werden Matrixeffekte der Harninhaltsstoffe auf die Signalintensität der einzelnen Analyten studiert.

Ein besonderer Schwerpunkt ist zusätzlich die Probenvorbereitung. Mittels einer geeigneten Technik sollen die RKM aus den wässrigen Proben herausgelöst und durch Verwendung von nur geringen Volumina an Lösungsmitteln möglichst stark aufkonzentriert werden.

Zusätzlich soll das Vorkommen der iodierten RKM in der Ruhr sowie im Rhein studiert werden.

Das Verhalten der iodierten RKM in der Bodenpassage ist dabei ein weiterer Schwerpunkt. Anhand von gepackten Bodensäulen soll das Verlagerungsverhalten der Diagnostika in unterschiedlichen Bodenarten ermittelt werden. Untersuchungen an flussnahen Grundwassermessstellen sollen zeigen, wie sich einige der betrachteten Stoffe unter realen Bedingungen verhalten.

Abschließend soll anhand von Harnproben eines Patienten die Ausscheidungskurve des Iopromids nach ordnungsgemäßer Applikation ermittelt werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Geräte und Materialien

Für die Bestimmung der Analyten in dieser Arbeit wurde ein *HPLC/MS-System* der Firma Thermo bestehend aus

- HPLC-Pumpe P4000 mit vorgeschaltetem Degaser SCM 1000
- einem Autosampler mit der Bezeichnung AS 3000
- und einem Ionenfallen-Massenspektrometer LCQ Duo
- Software: XCalibur Version 1.2

eingesetzt.

Stickstoffgenerator:

- ECO 1-5 „ESP“, DNT Ecoinert
- Kompressor (2000-40B), Jun Air

Waage:

- Satorius Analysenwaage (BP 210S), Satorius GmbH

pH-Meter:

- pH 96, WTW GmbH
- Elektrode: Standard-pH-Einstabmesskette E50, WTW GmbH

Vakuum Extraktionseinheit:

- Vakuumpumpe (SUE 300), Heto Lab Equipment
- Vakuumkammer (Macherey-Nagel GmbH Co. KG)

Schüttelmaschine:

- Laboshake (LS 2/5), Gerhardt GmbH & Co. KG

Evaporater:

- Turbo Vap (LV Evaporator), Zymark

Leitfähigkeitsmessgerät:

- Mikroprozessor Konduktometer (LF 196), WTW GmbH

HPLC-Säulen:

- Discovery HS C18 (Dimension: 150 x 2,1; 3 µm), Supelco
- Luna C18 (150 x 2,0; 5 µm), Phenomenex
- Gemini C18 (150 x 2,0; 3 µm), Phenomenex
- Synergi-Polar (250 x 2,0; 4 µm), Phenomenex

SPE-Kartuschen:

- Oasis HLB (Dimension: 500 mg/6 ml), Waters
- Strata X (500 mg/6 ml), Phenomenex
- Isolute ENV+ (200 mg/3 ml), IST
- Easy (200 mg/3 ml), Macherey-Nagel GmbH Co. KG
- Drug (200 mg/3 ml), Macherey-Nagel GmbH Co. KG
- C 18 Hydra (500 mg/6 ml), Macherey-Nagel GmbH Co. KG
- Tetracycline (500 mg/6 ml), Macherey-Nagel GmbH Co. KG
- Carbon (200 mg/3 ml), J.T. Baker
- Carbon (500 mg/6 ml), J.T. Baker

Filtrationsgerät:

- Filtrationsgerät aus Edelstahl
- Glasfaserfilter , Sartorius AG
- Wasserstrahlpumpe

Magnetrührer:

- IKAMAC RCT basic, IKA Labortechnik

Zentrifuge:

- Labofuge 200, Heraeus Instruments GmbH

Pipetten:

- Vollpipetten (1 ml; 2,5 ml; 5 ml; 20 ml)
- Pipette (100 – 1000µl), VWR International
- Pipette (10 – 100 µl), VWR International
- Pasteurpipetten

Messkolben Duran-Glas klar (10 ml, 20 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml)

Bechergläser Duran-Glas klar (100ml)

Scheidetrichter Duran-Glas klar (100 ml)

Glassäulen Duran-Glas klar (4 cm Durchmesser)

Rollrandgläschen aus Glas mit Bördekappe mit PTFE-beschichtetem Septum

Kühl-/Gefrierschrank

6.2 Chemikalien

In dieser Arbeit kamen folgende Chemikalien zum Einsatz:

Referenzsubstanzen:

Amidotrizoesäure (Reinheit 97,1 %), Sigma
Iothalamicsäure (keine Angabe, k.A.), U. S. Pharmacopeia
Iopamidol (k.A.), U. S. Pharmacopeia
Iohexol (k.A.), U. S. Pharmacopeia
Iopromid (97,9 %), U. S. Pharmacopeia
Iosarkol (k.A.), Dr. F. Köhler Chemie GmbH
Iomeprol (k.A.), Bracco
Iodixanol (k.A.), Amersham
Iopentol (k.A.), Amersham
Iobitridol (k.A.), Guerbet
Ioversol (k.A.), Tyco Healthcare

Sonstige Chemikalien:

Chlormequat chloride (zur Analyse; 98,8 %), Riedel-de Haën
Harnstoff (> 99,5 %), Merck
Harnsäure (> 99,7 %), VWR
Kreatinin (98 %), Alfa Aesar
Citronensäure (> 99,5 %), Alfa Aesar
NaCl (> 99,5 %), Merck
KHSO₄ (> 99 %), Merck
KH₂PO₄ (> 99 %), Merck
NaSO₄ wasserfrei (zur Analyse), Promochem
Methanol (zur Rückstandsanalytik), Promochem
Acetonitril (zur Rückstandsanalytik), Promochem
Essigsäureethylester (zur Rückstandsanalytik), Promochem

Cyclohexan (GC-rein), Merck
2-Propanol (HPLC-rein), Promochem
Wasser (HPLC-rein), Promochem
Methanol (HPLC-rein), Promochem
12.5 %ige HCl-Lösung, Merck
100 %ige Ameisensäure (> 99%), Merck
Seesand (reinst), Merck
Lithiumnitrat (> 98%), Merck
25 %ige NH₄OH-Lösung (zur Rückstandsanalytik), Fluka
Anionen-Kationen Tauscher 5, Merck

Multikomponenten-Stammlösung (ST1) der Referenzsubstanzen (c = 0,5 mg/ml):

Zur Herstellung der Stammlösungen (ST1) wurden die Referenzsubstanzen verwendet. Die exakt eingewogenen Substanzen (Tabelle 5) wurden in einem 50 ml Messkolben vereinigt und zunächst mit wenigen Millilitern 20/80 Vol.-%; Methanol/Wasser gelöst und anschließend bis zur Marke aufgefüllt.

Stammlösungen (ST2) der Referenzsubstanzen (c = 0,5 mg/ml):

Zur Herstellung der Stammlösungen (ST2) wurden die Referenzsubstanzen verwendet. Die exakt eingewogene Substanz wird in einem 50 ml Messkolben zunächst mit wenigen Millilitern HPLC-Wasser gelöst und anschließend bis zur Marke aufgefüllt. Für Iopamidol, Amidotrizoesäure und Iothalamicsäure wurde ein Lösungsmittelgemisch von (20/80 Vol.-%; Methanol/Wasser) verwendet.

Tabelle 5: Einwaagen der RKM zur Herstellung der Stammlösungen (ST1 + ST2)

Referenzsubstanz	Einwaage [mg]	verwendete Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [mg/ml]
Amidotrizoesäure	25,75	Methanol/HPLC-Wasser (v/v; 20/80)	0,5
lothalamicsäure	25,00	Methanol/HPLC-Wasser (v/v; 20/80)	0,5
lobitridol	25,00	HPLC-Wasser	0,5
lohexol	25,00	HPLC-Wasser	0,5
lomeprol	25,00	HPLC-Wasser	0,5
losarkol	25,00	HPLC-Wasser	0,5
lopromid	25,54	HPLC-Wasser	0,5
loversol	25,00	HPLC-Wasser	0,5
lopamidol	25,00	Methanol/HPLC-Wasser (v/v; 20/80)	0,5
lopentol	25,00	HPLC-Wasser	0,5
lodixanol	25,00	HPLC-Wasser	0,5

Multikomponenten-Zwischenverdünnung der Referenzsubstanzen ($c = 25 \text{ mg/l}$):

Für die Herstellung der Zwischenverdünnung (ZV) wurde 1 ml der jeweiligen Stammlösungen in einen 20 ml Messkolben vereint und mit HPLC-Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Multikomponenten-Zwischenverdünnung 2 der Referenzsubstanzen ($c = 25 \text{ mg/l}$ bzw. 50 mg/l):

Für die Herstellung der Zwischenverdünnung 2 (ZV2) wurde 1 ml der jeweiligen Stammlösungen für die nicht-ionischen RKM und 2 ml der ionischen RKM in einen 20 ml Messkolben vereint und mit HPLC-Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Stammlösung Totzeitmarker Chlormequat ($c = 0,5 \text{ mg/l}$):

10,12 mg der Substanz wurden in eine 20 ml Messkolben überführt und in wenigen Millilitern HPLC-Wasser gelöst. Danach wurde der Kolben bis zur Marke mit Methanol aufgefüllt und geschüttelt.

Zwischenverdünnung Totzeitmarker (2 mg/l):

Für die Herstellung der Zwischenverdünnung wurde 80 µl der Stammlösungen in einen 20 ml Messkolben pipettiert und mit HPLC-Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Bezugslösung Totzeitmarker (0,002 mg/l):

Für die Herstellung der Bezugslösung wurde 200 µl der Zwischenverdünnung in einen 20 ml Messkolben pipettiert und mit HPLC-Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Modellwässer:

unbelastetem Tiefengrundwasser (Reken Melchenberg; Tiefe >100 m)
abwasserfreies Oberflächenwasser (Waldgraben, Kevelaer)
menschlicher Harn

Modellböden:

Sandiger Boden (Uedorfer Boden)
Lehmiger Schluff (Meckenheimer Boden)

6.3 Optimierung der massenspektrometrischen Parameter

Die Optimierung der massenspektrometrischen Parameter wurde für jeden einzelnen Stoff durchgeführt und das jeweilige Ergebnis in Tunefiles abgelegt. Für die Erstellung der Tunefiles dient das vom Hersteller vorgegebene Programm „Tune Plus“. Das Programm besteht im Wesentlichen aus zwei Anwendungen, der „Automatische Tune“ und der „Manuelle Tune“. Zunächst wird das Massenspektrometer eingeschaltet und der jeweilige Einzelstoff ($c = 1 \text{ mg/l}$; 100 µl ST / 50 ml Methanol/HPLC-Wasser (v/v; 5/95)) mittels „flow injection“ eingeleitet. Unter „flow injection“ versteht man die direkte Injektion der Kalibrierlösung in das Interface des Massenspektrometers mittels regelbarer Spritzenpumpe mit zugeschaltetem HPLC-Fluss. Der Einsatz der „flow injection“ ermöglicht eine schnelle Einstellung und Optimierung aller MS-Parameter ohne vorherige chromatographische Trennung. Die im Massenspektrum entstehenden Ionen werden im positiven sowie negativen Ionisierungs-Modus studiert. Das Precursor-Ion mit dem stärksten Signal wird ausgewählt und für das automatische sowie manuelle Tunen verwendet.

Automatischer Tune:

Bei dieser Anwendung verändert das Programm automatisch verschiedene Parameter des Spektrometers und ermittelt die Einstellung die das stärkste Signal des vorher ausgewählten Precursor-Ions erzeugt. Im Wesentlichen werden hierbei elektrische Parameter beeinflusst wie zum Beispiel die Spannung der Kapillare, Spannung der beiden Octapole und anliegende Stromstärke des Sprays. Alle Parameter die in dem ‚Automatischen Tune‘ nicht optimiert werden, werden während des Tune- Vorgangs konstant gehalten (vom Gerät vorgegeben).

Manuelle Tune:

Die Vorgehensweise in dieser Anwendung ist vergleichbar mit dem ‚Automatischen Tune‘. Die Ausnahme ist, dass die Parameter in diesem Fall manuell variiert werden. Beim ‚Manuellen Tune‘ werden Parameter wie die ‚Sheath gas‘-Flussrate, ‚Aux gas‘-Flussrate und die Temperatur der Kapillare variiert, während die beim Automatischen Tune optimierten Parameter konstant gehalten werden.

Zusätzlich wurden mit Hilfe der „flow injection“ die bei der Fragmentierung entstehenden Fragmentationen der 1. Generation und der 2. Generation studiert. Hierzu wurde die Masse eines Precursor-Ions ausgewählt und mit Heliumatomen in der Ionenfalle zerschlagen. Je nach Stärke der Kollisionsenergie entstehen mehr oder weniger Fragmentationen. Die bestmögliche Einstellung wurde durch Variation der Kollisionsenergie ermittelt.

6.4 Optimierung der chromatographischen Trennung

Die chromatographische Trennung der Analyten wurde in der hier vorliegenden Arbeit an vier unterschiedlichen HPLC-Säulen unter gleichen Bedingungen untersucht. In der Tabelle 6 sind alle HPLC-Säulen mit ihren Eigenschaften zum Vergleich aufgelistet.

Tabelle 6: Tabellarische Zusammenfassung der eingesetzten HPLC-Säulen mit den dazugehörigen Eigenschaften.

Typ	Dimension [mm]	Partikelgröße [µm]	Porengröße (Å)	Oberfläche (m ² /g)	Kohlenstoff (%)	Endcapping
Discovery HS C18	150 x 2,1	5	120	300	20	ja
Luna	150 x 2,0	3	100	400	17,5	ja
Gemini	150 x 2,0	3	110	375	14	ja
Synergi-Polar	250 x 2,0	5	80	475	11	ja, hydrophil

Die Trennung der Analyten erfolgte mittels zwei unterschiedlicher isokratischer Systeme. Die Dauer eines Durchlaufs betrug dabei 30 Minuten. Es wurden Lösungsmittelgemische Wasser/Methanol von 95/5 Vol.-% und 90/10 Vol.-% getestet. Alle Laufmittel wurden mit Ameisensäure angesäuert (0,5 Vol.-% Ameisensäure). Die Säulentemperatur betrug einheitlich 55 °C. Es wurden 10 µl Probenvolumen injiziert. Der Lösungsmittelfluss wurde für alle Versuche mit 0,3 ml/min festgelegt. Die Konzentrationen der Multikomponentenlösung betrug dabei 1 mg/l (800 µl ZV / 20 ml HPLC-Wasser).

Mit der für die Trennung der Röntgenkontrastmittel am besten geeigneten HPLC-Säule wurden weitere Versuche zur Optimierung durchgeführt. Neben der Einführung eines Gradientenprogramms wurde der Einfluss der Ameisensäurekonzentration (0,1 Vol.-%, 0,25 Vol.-% und 0,5 Vol.-%) des Laufmittels auf das Trennverhalten der Arzneimittel unter gleichen Bedingungen untersucht. Die Konzentrationen der Multikomponentenlösung betrug dabei 1 mg/l (800 µl ZV / 20 ml HPLC-Wasser).

Zusätzlich wurde der Einfluss des Injektionsvolumens auf die Peakform studiert. Dazu wurde das Injektionsvolumen bei gleich bleibender absolut injizierter Menge Analyt (0,05 µg je RKM absolut) schrittweise erhöht. Es wurden die Volumina 5 µl, 20 µl, 100 µl und 200 µl getestet. Die einzelnen Bezugslösungen betrugen dabei die in der Tabelle 7 angegebenen Konzentrationen.

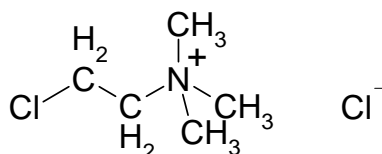
Tabelle 7: Ansatz der Bezugslösungen zu den Versuchen zum Injektionsvolumen.

Injiziertes Volumen	Konzentration der Bezugslösung	Ansatz
[µl]	[mg/l]	[x µl ZV / 2 ml Methanol /HPLC-Wasser (v/v; 5/95)]
5	10,0	800
20	2,5	200
100	0,5	40
200	0,25	20

Ebenso wurde der Einfluss des Lösungsmittels der zu injizierenden Probe überprüft. Die Lösemittelzusammensetzung wurde variiert. Für die Variation des Lösungsmittels wurden sieben verschiedene Zusammensetzungen gewählt. Neben reinem Wasser wurden auch 95/5, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50 Vol.-% Wasser/Methanol untersucht. Die Konzentration der Multikomponentenlösung betrug dabei 1 mg/l (800 µl ZV / 20 ml HPLC-Wasser).

Totzeit der HPLC-Säulen

Die Totzeit jeder Säule wurde mit dem organischen Salz Chlormequat bestimmt. In der folgenden Abbildung ist die Strukturformel dargestellt. Aufgrund seines Salzcharakters und der daraus resultierenden Polarität wurde davon ausgegangen, dass es keine Wechselwirkung mit C18-Säulen aufzeigt. Das Salz wird somit ohne Rückhalt von der jeweiligen Säule eluiert. Die Retentionszeit entspricht der Totzeit.



$$M = 158 \text{ g/mol}$$

$$[M+H]^+ = 122$$

Abbildung 10: Strukturformel des organischen Salzes Chlormequat, das zur Ermittlung der Totzeit eingesetzt wurde.

Der Stoff Chlormequat wurde anhand des Precursor-Ions $[M+H]^+$ -Ion 122 im ESI-positiv-Modus detektiert. Die Konzentration betrug dabei 0,002 mg/l (Kapitel 6.2).

6.5 Untersuchung von Harn induzierten Matrixeffekten

Hier soll der Einfluss von Harn-Inhaltsstoffe auf die Signalintensität der Analyten überprüft werden. Untersucht wurden drei organische Inhaltstoffe und drei anorganische Salze. Die beschriebenen Lösungen in diesem Kapitel wurden aus deionisierten Wasser hergestellt. Aus der Stammlösung wurden die einzelnen Verdünnungen angesetzt. Zu jeder Verdünnung wurden die untersuchten iodierten Röntgenkontrastmittel dotiert. Die Konzentration der Diagnostika betrug dabei 1 mg/l. Es wurden 20 µl der Lösung direkt in die HPLC-MS injiziert. In der Tabelle 8 sind die Verdünnungsschritte detailliert beschrieben. Die Konzentrationen der organischen Harn-Inhaltsstoffe wurden so gewählt, dass die maximale Konzentration dem des unverdünnten Harns entspricht. Bei den anorganischen Inhaltsstoffen wurden bewusst niedrigere Konzentrationen gewählt, um eine irreversible Verstopfung der beheizten Kapillare zu vermeiden.

Zusätzlich wurde die Retention der Harn-Inhaltsstoffe auf der HPLC-Säule, die für die Analytik der RKM Verwendung findet, studiert. Dazu wurde Ioversol mit einer Konzentration von 4,0 mg/l mittels regelbarer Spritzenpumpe kontinuierlich in das Interface des Massenspektrometers geleitet und aufgenommen. Bei gleich

bleibender Konzentration des Analyten erhält man eine Basislinie des Ioversols. Zusätzlich wurde der jeweilige Harn-Inhaltsstoff über das HPLC-System mit der entsprechenden RKM-Methode injiziert (20 µl, diskontinuierlich). Der Ausgang der HPLC-Säule wurde mit der regelbaren Spritzenpumpe über ein T-Stück gekoppelt. Als Injektionslösung wurden die jeweiligen höchsten Konzentrationen aus Tabelle 8 verwendet. Die Inhaltsstoffe, die das Signal des Analyten positiv oder negativ beeinflussen, führen zu einem Anstieg bzw. Einbruch der Basislinie des Analyten.

Tabelle 8: Konzentration der Einzellösungen zur Untersuchung möglicher Matrixeffekte durch Harn-Inhaltsstoffe.

Lösung		Harnstoff	Kreatinin	Zitronensäure	NaCl	KHSO ₄	KH ₂ PO ₄
Stammlösung [g/L]		100	10	10	100	10	10
Verdünnungen [g/L]	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	2	0,100	0,300	0,100	0,005	0,100	0,100
	3	0,250	0,600	0,200	0,025	0,200	0,200
	4	0,500	0,900	0,300	0,050	0,300	0,300
	5	0,750	1,200	0,400	0,075	0,400	0,400
	6	1,000	1,500	0,500	0,100	0,500	0,500
	7	2,000	-	-	0,250	1,000	1,000
	8	4,000	-	-	0,500	1,500	2,000
	9	8,000	-	-	0,750	2,000	3,000
	10	12,000	-	-	1,000	2,500	4,000
	11	16,000	-	-	2,500	3,000	-
	12	20,000	-	-	4,000	3,500	-
	13	-	-	-	-	4,000	-

Zusätzlich zu den Versuchen der Einzellösungen wurde realer Harn und ein aus den Inhaltsstoffen nachgestellter Harn (Synthetischer Harn) hinsichtlich der Matrixeffekte untersucht und verglichen. Die Zusammensetzung und der Ansatz des synthetischen Harns ist in der Tabelle 9 detailliert beschrieben. Für die Herstellung wurde deionisiertes Wasser verwendet.

Tabelle 9: Ansatz und Zusammensetzung des synthetischen Harns.

Inhaltsstoffe	Synthetischer Harn [g/L]	Ansatz [x ml ST / 20 ml Wasser]
Harnstoff	20,0	4,0
Kreatinin	1,5	3,0
Zitronensäure	0,5	0,1
Na ⁺	5,9	3,0 (NaCl)
K ⁺	2,7	-
Cl ⁻	9,1	-
PO ₄ ³⁻	4,1	1,17 (KH ₂ PO ₄)
SO ₄ ²⁻	2,4	0,68 (KHSO ₄)

Um den Einfluss der Konzentration des realen Harns auf die Signalintensität der einzelnen Röntgenkontrastmittel zu untersuchen, wurde eine Verdünnungsreihe des realen und des nachgestellten Harns angesetzt und untersucht.

Die Verdünnungsreihe hat folgende Zusammenstellung:

1. 1/0 (1ml Harn in 0 ml Wasser)
2. 1/10 (1ml Harn in 10 ml Wasser)
3. 1/100 (1ml Harn in 100 ml Wasser)
4. 1/1000 (1ml Harn in 1000 ml Wasser)
5. 1/10000 (1ml Harn in 10000 ml Wasser)

6.6 Optimierung der Probenvorbereitung

6.6.1 Flüssig/Flüssig-Extraktion

500 ml unbelastetes Tiefengrundwasser wurden mit 1 mL der Zwischenverdünnung (siehe Kapitel 6.2) dotiert. 20 mL von der wässrigen Lösung ($c = 0,05 \text{ mg/L}$) wurden in einem Scheidetrichter überführt und mit HCl auf pH 3 angesäuert. Anschließend wurde die Extraktionslösung mit 10 mL eines Lösungsmittels 15 Minuten mit einer Schüttelfrequenz von 120 min^{-1} extrahiert. Es kamen verschiedene organische Lösungsmittel zum Einsatz. Neben Essigsäureethylester und Cyclohexan wurden auch Lösungsmittelgemische wie Dichlormethan / 2-Propanol (v/v; 3/1), Cyclohexan / 2-Propanol (v/v; 4/1) und Essigsäureethylester / Cyclohexan (v/v; 4/1) untersucht. Die organische Phase wurde mit NaSO₄ (wasserfrei) in einem Becherglas getrocknet und im Stickstoffstrom bei Raumtemperatur bis auf etwa 1 mL abgedampft. Der Rückstand wurde mittels eingesetztem Extraktionsmittel in ein Spitzgläschen überführt und nochmals im Stickstoffstrom bei 40 °C im Wasserbad bis zur Trockene ab-

gedampft. Anschließend wurde auf 1 mL mit Methanol/Wasser (v/v; 5/95) aufgefüllt. Das Extrakt wurde im Anschluss an der HPLC/MS analysiert.

6.6.2 Festphasen-Extraktion

6.6.2.1 Matrixarme wässrige Proben

Es wurde der Einsatz von 9 verschiedenen Festphasen unter gleichen Bedingungen getestet. In der Tabelle 10 sind die Eigenschaften der Festphasen zusammengefasst dargestellt. Neben der Bezeichnung der Festphase und Firmennamen beinhaltet die Tabelle auch Informationen über das verwendete Sorbens, Dimension, mittlere Porengröße und spezifische Oberfläche.

Tabelle 10: Zusammenfassung der in dieser Arbeit untersuchten Festphasen.

Festphase	Hersteller	Sorbens	Dimension [mg]	Mittlere Porengröße [Å]	Spezifische Oberfläche [m ² /g]
Oasis HLB	Waters	hydrophiler und lipophiler Copolymer	500	80	810
Strata X	Phenomenex	Polymerphase	500	85	800
Isolute ENV+	IST	Polystyrol Divinylbenzol	200	k.A.	1000
Easy	Machery&Nagel	Polystyrol Divinylbenzol	200	50	650-700
Drug	Machery&Nagel	Octadecyl-Kieselgel	200	60	500
C18 Hydra	Machery&Nagel	Octadecyl-Kieselgel	500	60	500
Tetracycline	Machery&Nagel	Octadecyl-Kieselgel	500	60	500
Carbon	J.T.Baker	Aktivkohle	200	k.A.	1300
Carbon	J.T.Baker	Aktivkohle	1000	k.A.	1300
NH2	Machery&Nagel	Aminopropyl-Kieselgel	200	60	500

k.A. = keine Angaben

Die Anreicherung der Analyten erfolgte nach dem in Abbildung 11 aufgezeigten Probenaufbereitungsverfahren. Für jede getestete Festphase wurde zusätzlich der Durchbruch der Analyten bestimmt. Dazu wurde nach der zu untersuchenden Festphase eine zweite Kartusche geschaltet. Als zweite Kartusche kam die ENV+ von Isolute zum Einsatz. Kommt es zu einem Durchbruch der Röntgenkontrastmittel an der zu testenden Festphase, so werden diese Analyten an der zweiten Kartusche angereichert. Die zweite Kartusche wurde genauso aufgearbeitet wie die übrigen Festphasen. Analysiert wurden die Extrakte mit dem optimierten HPLC-MS-Verfahren.

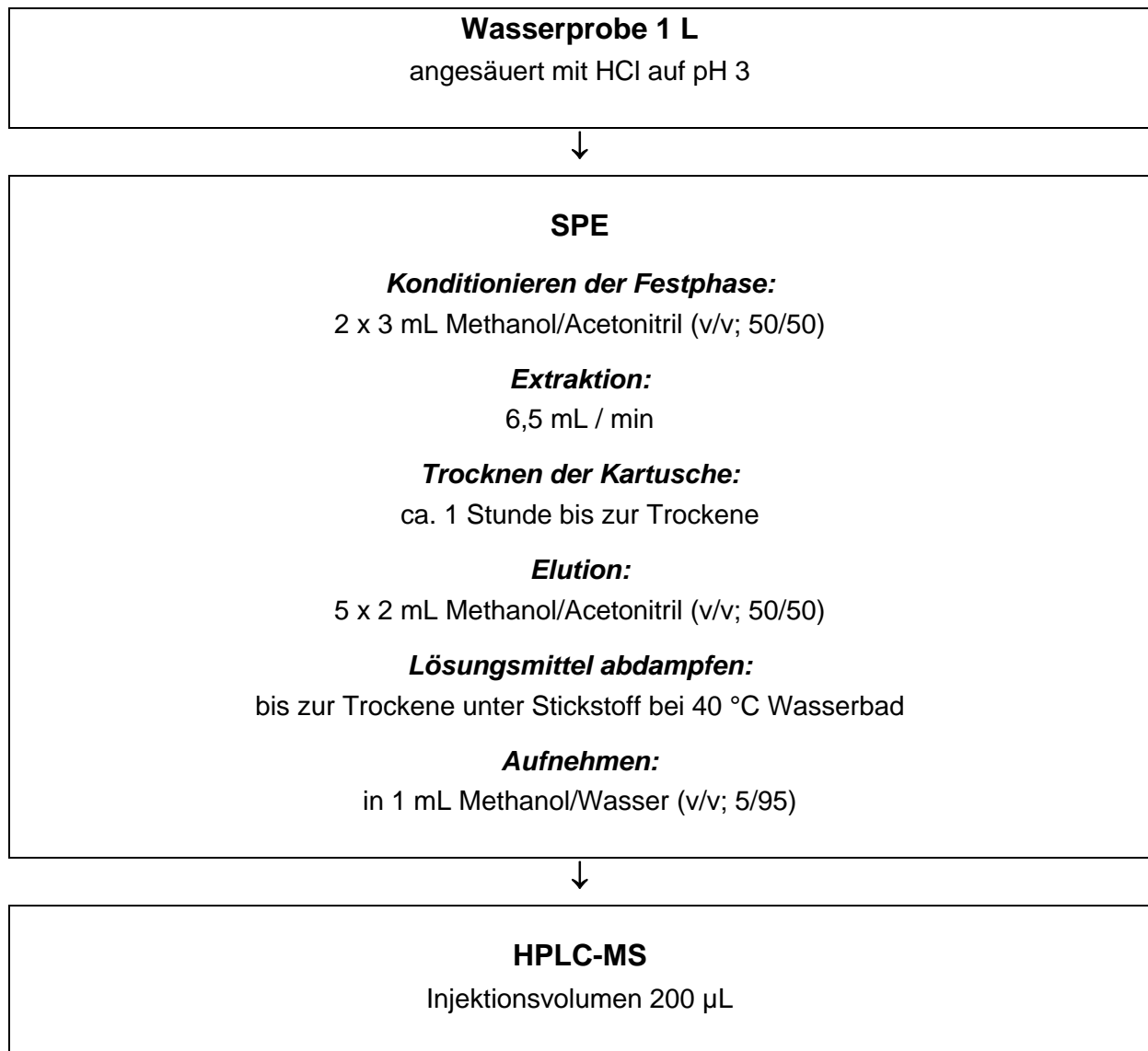


Abbildung 11: Fließschema der Probenaufarbeitung zur Bestimmung der iodierten Röntgenkontrastmittel in Trink- und Oberflächenwasser.

Bei Verwendung von Oberflächenwasser als Modellwasser wurden die Wasserproben im Vorfeld filtriert, um ein Verstopfen der Festphasenkartusche zu vermeiden. Dazu wurde die Wasserprobe über ein Glasfaserfilter filtriert. Das Sorptionsverhalten der RKM an dem Glasfaserfilter wurde untersucht. Dazu wurde eine Bezugslösung vor und nach Filtration vermessen. Die Konzentrationen der Multikomponentenlösung betrug dabei 1 mg/l (800 µl ZV / 20 ml HPLC-Wasser).

Aussalzversuche

Zur Durchführung der Aussalzversuche wurden jeweils zu einem Liter aufzuarbeitende Probe eine entsprechende Menge NaCl zugegeben. Es wurden die Kon-

zentrationen 0 g/l, 2,5 g/l und 5 g/l getestet. Es wurden jeweils drei Parallelmessungen durchgeführt.

6.6.2.2 Stark matrixbehafteter wässrige Proben (menschlicher Harn)

Um den Einfluss ungewünschter Matrixbestandteile zu eliminieren und zusätzlich eine Anreicherung der Analyten erreichen zu können, wurden in dieser Arbeit verschiedene Probenvorbereitungstechniken auf deren Tauglichkeit hin untersucht. Als Modell stark matrixbehafteter Proben wurde menschlicher Harn eingesetzt.

Festphasen-Extraktion

Nach dem in Abbildung 11 aufgezeigten Probeaufbereitungsverfahren, erfolgte die Anreicherung der Analyten an der ENV+ -Festphase mit Ausnahme des Probenvolumens. Statt 1 Liter Probe wurde nur 10 ml Harn extrahiert. Die Konzentration des Harns an RKM betrug dabei 1 mg/l.

Festphasen-Extraktion mit vorheriger Verdünnung

Vor Anreicherung der RKM wurden 10 ml des Harns in Wasser verdünnt und dann nach dem in Abbildung 11 aufgezeigten Probenaufbereitungsverfahren extrahiert. Es wurden verschiedene Wasser-Volumina untersucht. Dabei sind 10 ml Harn in 250 ml, 500 ml, 750 ml und 1000 ml Wasser verdünnt worden.

Proteinfällung

Zur Durchführung einer Eiweißfällung wurden 20 ml Harn in ein 100 ml Becherglas pipettiert und mit 20 ml Methanol versetzt. Die Lösung wurde 10 Minuten auf einem Magnetrührer gerührt. Mittels Zentrifuge wurde das ausgefallene Eiweiß von der Lösung abgetrennt (15 Minuten; 5000 U/min).

clean up der Extrakte

Die nach der Festphasenextraktion erhaltenen Harn-Extrakte wurden über verschiedene SPE-Festphasen filtriert, um störende organische Matrixbestandteile des Urins von den betrachteten Analyten zu trennen. Dazu wurde der komplette Extrakt auf eine Kartusche überführt und mit leichtem Druck durch die Kartusche filtriert. In der folgenden Tabelle sind die 2 untersuchten SPE-Kartuschen aufgelistet.

Tabelle 11: Zusammenfassung der in dieser Arbeit untersuchten Festphasen für die Durchführung des „clean-ups“ der Harn-Extrakte

Festphase	Hersteller	Sorbens	Dimension [mg]	Mittlere Porengröße [Å]	Spezifische Oberfläche [m ² /g]
Florisil	Machery&Nagel	Magnesiumsilikat (MgO-SiOH)	200	k.A.	k.A.
NH ₂	Machery&Nagel	Aminopropylmodifiziertes Kiesegel	200	60	500
Ionentauscher	Merck	Anionen/Kationentauscher	-	-	-

k.A. = keine Angaben

Elution der ionischen RKM von der NH₂-Kartusche

Die nach der Reinigung des Harn-Extraktes erhaltenen NH₂-Kartuschen wurden etwa 1 Stunde lang getrocknet und mit verschiedenen Elutionsmitteln getestet. Neben reinem Hexan wurde ein Methanol/Acetonitril-Gemisch (50/50; v/v), ein ammoniakalisches Methanol/Acetonitril-Gemisch (50/50; v/v; + 2,5 Vol.-% NH₄OH-Lösung (25 %ig)) und eine Ammoniaklösung (2,5 Vol.-% NH₄OH-Lösung (25 %ig)) getestet. Hierbei wurden jeweils 5 x 2 ml Elutionsmittel eingesetzt.

6.7 Validierung der Analysenverfahren

In den folgenden Unterkapiteln ist die Vorgehensweise der Validierung der einzelnen Verfahren beschrieben. Dabei ist zu beachten, dass die Anzahl der Kalibrierungspunkte sowie die Zahl der Parallelmessungen abhängig von der Matrixbeschaffenheit der Proben bzw. Extrakte sind. Die Extrakte matrixreicher Proben führten zum Teil zu starken Verstopfungen der geheizten Kapillare, somit wurden weniger umfangreiche Validierungen durchgeführt. Die Proben der direkten Messung konnten nahezu ohne Probleme vermessen werden.

6.7.1 Matrixarme wässrige Proben

Ohne Probenvorbereitung - Direkt Injektion

Zur Aufnahme der Verfahrenskenndaten der iodierten RKM (Amidotrizoesäure, Iothalamidsäure, Iopamidol, Iohexol, Iopromid, Iosarkol, Iomeprol, Iodixanol, Iopentol, Iobitridol, Ioversol) wurden die in Tabelle 12 dargestellten Bezugslösungen verwendet. Als Modellwasser kam unbelastetes Tiefengrundwasser zum Einsatz. Es wurde eine 11-Punkt-Kalibrierung mit jeweils 5 Wiederholungsmessungen durchgeführt. Der Konzentrationsbereich der Bezugslösungen lag zwischen 0,025 bis 0,275 mg/l. Sie wurden aus der Zwischenverdünnung (ZV) hergestellt.

Tabelle 12: Ansatzschema und Konzentration der RKM-Bezugslösung aus der Zwischenverdünnung (ZV) zur Validierung des Verfahrens mittels Direktinjektion

Lösung		Konzentration je RKM [mg/l]	Pipettiervolumen ZV [ml]	Endvolumen [ml]
Bezugslösungen [g/L]	1	0,025	0,10	100
	2	0,050	0,20	
	3	0,075	0,30	
	4	0,100	0,40	
	5	0,125	0,50	
	6	0,150	0,60	
	7	0,175	0,70	
	8	0,200	0,80	
	9	0,225	0,90	
	10	0,250	1,00	
	11	0,275	1,10	

Mit Probenvorbereitung – Festphasen-Extraktion

Zur Aufnahme der Verfahrenskenndaten der iodierten RKM (Amidotrizoesäure, lothalamicsäure, lopamidol, lohexol, lopromid, losarkol, lomeprol, lodixanol, lopentol, lobitridol, loversol) für Trinkwasser und Oberflächenwasser kamen die in Tabelle 13 aufgeführten Bezugslösungen zur Anwendung. Es wurde jeweils eine 5-Punkt-Kalibrierung mit jeweils 3 Wiederholungsmessungen durchgeführt. Der Konzentrationsbereich der Lösungen lag zwischen 0,1 bis 0,5 mg/l, die aus der Zwischenverdünnung (ZV) hergestellt wurden. Die Bezugslösungen wurden zur Probendotierung verwendet. Es wurden 1 ml der jeweiligen Bezugslösung in 1 l Wasser (Trinkwasser und Oberflächenwasser) dotiert, sodass daraus eine Konzentration der Wasserproben von 0,1 – 0,5 µg/l resultierte.

Tabelle 13: Ansatzschema und Konzentration der RKM-Bezugslösungen aus der Zwischenverdünnung (ZV) zur Validierung des Verfahrens (Festphasenextraktion Trinkwasser und Oberflächenwasser), Konzentration der Wasserproben

Lösung		Konzentration der Bezugslösung je RKM [mg/l]	Pipettivolumen ZV [ml]	Endvolumen [ml]	Konzentration der Wasserprobe [µg/l]
Bezugslösungen	1	0,10	0,40	100	0,10
	2	0,20	0,80		0,20
	3	0,30	1,20		0,30
	4	0,40	1,60		0,40
	5	0,50	2,00		0,50

6.7.2 Stark matrixbehaftete wässrige Proben (menschlicher Harn)

Ohne Probenvorbereitung - Direkt Injektion

Zur Aufnahme der Verfahrenskennndaten wurden die in Tabelle 14 dargestellten Bezugslösungen verwendet. Es wurde eine 9-Punkt-Kalibrierung mit jeweils 4 Wiederholungsmessungen durchgeführt. Der Konzentrationsbereich der RKM-Lösungen lag zwischen 1,0 bis 20,0 mg/l (Amidotrizoesäure, lothalamicsäure, lopamidol, lohexol, lopromid, losarkol, lomeprol, lodixanol, lopentol, lobitridol, loversol). Vor Injektion in das HPLC-MS wurde der dotierte Harn jeweils 1/100 verdünnt. Dazu wurde 1 ml Harn in einen 100 ml Messkolben überführt und mit Trinkwasser (Reken Melchenberg) aufgefüllt.

Tabelle 14: Ansatzschema und Konzentration der RKM-Bezugslösungen aus der Stammlösung 1 zur Validierung des Verfahrens Direktinjektion (Harn)

Lösung		Konzentration je RKM [mg/l]	Pipettivolumen ST1 [ml]	Endvolumen Harn [ml]
Bezugslösungen [g/L]	1	1,00	0,02	10
	2	2,50	0,05	
	3	5,00	0,10	
	4	7,50	0,15	
	5	10,00	0,20	
	6	12,50	0,25	
	7	15,00	0,30	
	8	17,50	0,35	
	9	20,00	0,40	

Mit Probenvorbereitung - Direkt Injektion

Zur Aufnahme der Verfahrenskenndaten wurden die in Tabelle 15 dargestellten Bezugslösungen verwendet. Es wurde eine 5-Punkt-Kalibrierung mit 3 Wiederholungsmessungen durchgeführt. Der Konzentrationsbereich der Lösungen lag zwischen 0,5 bis 2,5 mg/l für die nicht-ionischen RKM (Iopamidol, Iohexol, Iopromid, Iosarkol, Iomeprol, Iodixanol, Iopentol, Iobitridol, Ioversol) und zwischen 1,0 bis 5,0 mg/l für die beiden ionischen Diagnostika (Amidotrizoesäure, Iothalamidsäure). Sie wurden aus der Zwischenverdünnung 2 (ZV2) hergestellt. Die Bezugslösungen wurden zur Probendotierung verwendet. Es wurden 1 ml der jeweiligen Bezugslösung in 10 ml Harn dotiert, sodass daraus eine Konzentration der von 50 µg – 250 µg/l für die nicht ionischen und das doppelte für die ionischen RKM resultierte.

Tabelle 15: Ansatzschema und Konzentration der RKM-Bezugslösungen aus der Zwischenverdünnung 2 (ZV2) zur Validierung des Verfahrens (Festphasenextraktion Harn), Konzentration der Harnproben

Lösung	Pipettivolumen ZV2 [ml]	Endvolumen [ml]	Konzentration der Bezugslösung (BZ) je RKM [mg/l]		Konzentration je RKM der Harnprobe [1ml BZ / 10 ml Harn] [mg/l]		
			nicht-ionische RKM	ionische RKM	nicht-ionische RKM	ionische RKM	
Bezugslösungen	1	1,00		0,50	1,00	0,05	0,10
	2	2,00		1,00	2,00	0,10	0,20
	3	3,00	50	1,50	3,00	0,15	0,30
	4	4,00		2,00	4,00	0,20	0,40
	5	5,00		2,50	5,00	0,25	0,50

6.8 Stabilitätstest der RKM in matrixarmen und stark matrixbehafteten wässrigen Proben

Zur Durchführung wurde Harn aus einem Gelbwasserspeicher entnommen und mit den zu untersuchenden Röntgenkontrastmitteln dotiert. Die Konzentration der nicht-ionischen RKM betrug 2 mg/l, die der ionischen 10 mg/l, wobei der pH-Wert bei 9,0 lag. Die Röntgenkontrastmittelkonzentrationen wurden so gewählt, dass die gelagerten Proben ohne Anreicherung mittels Direktinjektion bis auf etwa 95 % Eliminierung bestimmt werden können. Nach Dotierung und Durchmischung wurden 4 Glasflaschen mit je 100 ml Harn befüllt. Anschließend wurde der pH-Wert mit konz. Schwefelsäure auf pH 4 eingestellt. Wiederum wurden 4 Flaschen zu je 100 ml abgefüllt. Zuletzt wurde der pH-Wert auf pH 2 eingestellt und abgefüllt. Parallel wurde der gleiche Ansatz mit Trinkwasser durchgeführt. Der Zeitraum des Versuchs wurde auf 5 Monate festgelegt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 25 °C. Im Turnus von 4 Wochen wurde die Stabilität des pH-Wertes überprüft. Die genommenen Harnproben wurden bei –18 °C eingefroren, um sie zu einem späteren Zeitpunkt gleichzeitig analysieren zu können.

6.9 Vorkommen und Verhalten ausgewählter Röntgenkontrastmittel in der aquatischen Umwelt

6.9.1 Monitoring iodierter Röntgenkontrastmittel in der Ruhr, im Rhein und in flussnahen Grundwassermessstellen

Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation wurden die ausgewählten elf Röntgenkontrastmittel in den Oberflächengewässern Rhein (Rees und Düsseldorf) und Ruhr (Mülheim) untersucht. In dem Beprobungszeitraum vom 24.11.2005 bis zum 11.05.2006 wurden an den Messstellen etwa zweiwöchentlich Proben entnommen. Zusätzlich wurden zwei Rhein nahe Grundwassermessstellen (GWM) beprobt. Nach Entnahme wurden die Wasserproben bei 4°C bis zur Messung, maximal 2 Wochen lang, gelagert.

Um niedrigere Bestimmungsgrenzen der RKM zu erreichen, wurden in diesem Fall statt 1 l Wasser 2 l Wasser aufgearbeitet. In der folgenden Abbildung 12 ist der Lageplan der beiden GWM dargestellt.

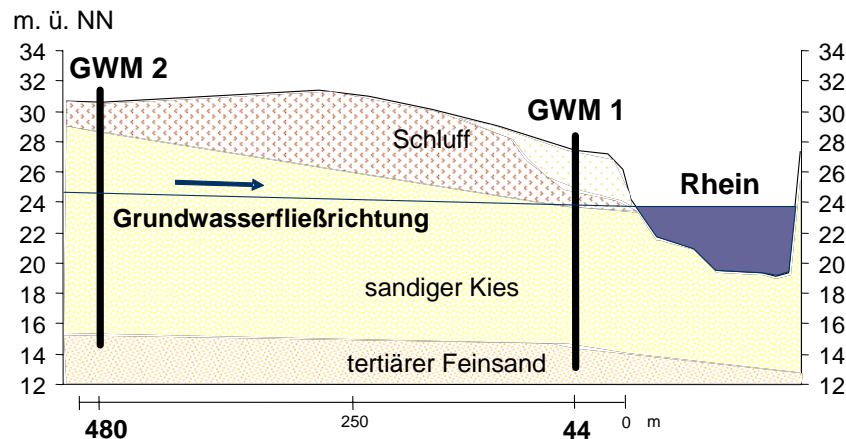


Abbildung 12: Lageplan der beiden untersuchten Rhein nahen Grundwassermessstellen.

6.9.2 Transportverhalten iodierter Röntgenkontrastmittel in Bodensäulen

Die Versuchsanlage besteht aus insgesamt drei Säulen mit einer Nutzhöhe von 14 cm. Die Säulen werden am unteren Ende von einer Chromatographiesäule mit eingeschmolzener Fritte und Hahn abgeschlossen. Das Material der verwendeten Säulen besteht aus Glas, um Sorptionsprozesse der Röntgenkontrastmittel zu minimieren. Die Grundfüllung jeder Säule ist identisch. In der unteren Chromatographiesäule ist eine Stützschrift aus Seesand mit der Körnung 0,1 bis 0,3 mm eingebaut. Der Einbau der Stützschrift erfolgte nach Fluten der Chromatographiesäule. Auf die Stützschrift folgt die Säulenfüllung, die portionsweise bei gleichzeitiger Flutung eingebracht und manuell verdichtet wurde. Auf das Probenmaterial wurde ein Papierfilter aufgebracht. In der Abbildung 13 ist der schematische Aufbau einer Bodensäule dargestellt.

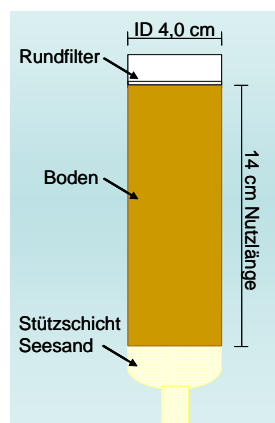


Abbildung 13: Schematische Darstellung einer Bodensäule.

Im Folgenden werden die zwei Säulenfüllungen beschrieben.

Säule I: Uedorfer Boden

Der „Uedorfer Boden“ ist ein sandiger Boden aus der Nähe von der Stadt Bonn. Der Skelettanteil größer 2 mm wurde abgesiebt. Lagerung und Einbau des Bodens erfolgte luftgetrocknet [27].

Tabelle 16: Bodencharakterisierung des Uedorfer Bodens

	Boden [Masse-%]
C_{org}	0,85
$CaCO_3$	< 0,2
Grobsand	3,1
Mittelsand	55,4
Feinsand	17,8
Grobschluff	8,2
Mittelschluff	5,6
Feinschluff	4,6
Ton	5,3

Säule II: Meckenheimer Boden

Bei dem „Meckenheimer Boden“ handelt es sich um einen lehmigen Schluff aus der Nähe von der Stadt Bonn. Das verwendete Bodenmaterial wurde im Jahr 2002 am Standort entnommen. Der Skelettanteil größer 2 mm wurde abgesiebt. Der Boden wurde luftgetrocknet gelagert und in diesem Zustand in die Säule eingebaut [27].

Tabelle 17: Bodencharakterisierung des Meckenheimer Bodens

	Boden [Masse-%]
C_{org}	0,75
$CaCO_3$	< 0,2
Grobsand	1,3
Mittelsand	2,5
Feinsand	3,1
Grobschluff	50,3
Mittelschluff	20,9
Feinschluff	6,0
Ton	16,0

Versuchsdurchführung

Vor dem Start der Versuche wurden alle drei Säulen mit Wasser gesättigt. Danach wurden die Bodenabläufe geöffnet. Nach einer halben Stunde sind von jedem Arzneistoff 2 mg pro Säule appliziert worden. Die Dotierung wurde mittels einer wässrigen Multikomponentenlösung durchgeführt. Zwei der drei Säulen wurden mit den ausgewählten Röntgenkontrastmitteln dotiert. Die Lösung enthielt 200 mg/l je Stoff. Die dritte Bodensäule wurde analog der beiden vorher genannten Säulen ebenfalls dotiert, jedoch ohne Arzneimittel. Sie wurde zur Ermittlung des Blindwertes analog betrieben. Die Beregnung der Bodensäulen fand unter diskontinuierlichen Bedingungen statt (1. Tag Beregnung, der darauf folgende 2. Tag keine Beregnung) um ein partielles Trockenfallen der Säulen zu garantieren. Es wurde mit einem Volumen von jeweils 10 ml beregnet, was bei einer Bodenoberfläche von 12,6 cm² eine Niederschlagshöhe von 8 mm entspricht. Die Bewässerung der Bodensäulen erfolgte mit Tiefengrundwasser aus Reken Melchenberg. Das so entstandene Sickerwasser jeder Säule wurde in einer Glasflasche aufgefangen und quantifiziert und bis zur Messung bei 4°C gelagert.

Nach Beendigung der Probenahme für die Wirkstoffanalytik wurden an den drei Säulen Tracerversuche durchgeführt. Ziel der Untersuchungen war es, weitere Aussagen über die hydraulischen Verhältnisse und ihre Einflüsse auf das Stofftransportverhalten in den Säulen zu erhalten. Anlehnend einschlägiger Literaturdaten wurde als Tracer das Lithiumion eingesetzt [28]. Als Salz kam Lithiumnitrat zur Anwendung. Vor der Zugabe der Tracer war darauf zu achten, dass in den Säulen dieselben hydraulischen Bedingungen vorherrschen wie beim Versuchsstart. Somit wurden die Säulen vor der Tracerzugabe aufgesättigt. Die Dotierung des Tracers erfolgte analog der Arzneistoffe mit einem Aufgabevolumen von 10 ml. Die Konzentration der Lithiumnitratlösung betrug 500 mg/l. Die Beregnung der Säulen wurde ebenfalls analog der vorangegangenen Versuche durchgeführt. Der Durchbruch des Lithiumions wurde mittels Leitfähigkeitsmessung überwacht.

6.10 Ermittlung der Ausscheidungskurve von Iopromid nach Applikation über den menschlichen Harn

Zur Aufnahme einer Ausscheidungskurve wurde der Harn eines Patienten über einen Zeitraum von etwa 24 Stunden gesammelt. Dem Patienten wurden zuvor, um 9³⁰ Uhr morgens, 40 g des Iopromids in Form des handelsüblichen Präparats injiziert. Nach Erfassung des jeweils anfallenden Volumens bis 5³⁰ Uhr des darauf folgenden Tages, wurden die Proben bis zur Messung bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert. Vor der Messung der jeweiligen Harnproben wurden diese über einem Glasfaserfilter

filtriert und mit dem entsprechenden Lösungsmittelgemisch (Methanol/Wasser (v/v; 5/95) 1/10000 verdünnt.

7 Ergebnisse und Diskussion

7.1 Optimierung der massenspektrometrische Detektion

Die massenspektrometrische Detektion erfolgte mittels Ionisierung der Analyten an der ESI-Quelle im positiven Modus. Im negativen Modus waren keine detektierbaren Ionen vorhanden. Auch die Versuche mit der APCI-Quelle zeigten, dass eine Ionisierung mittels APCI weder im positiven noch im negativen Modus möglich ist. Die optimierten MS-Parameter der im ESI-positiv-Modus detektierten Precursorionen sind in der folgenden Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 18: Zusammenfassung der optimierten MS-Parameter der betrachteten Kontrastmittel bei Ionisierung im positiven ESI-Modus. Neben einigen elektrischen Parametern wurden auch die Flussraten von Sheath und Aux Gas sowie die Temperatur der beheizten Kapillare aufgezählt.

		← Automatischer Tune →			← Manueller Tune →			
Substanz		anliegende Stromstärke des Sprays	Spannung der beheizten Kapillare	Spannung am ersten Octapol	Spannung am zweiten Octapol	Sheath Gas Flussrate (30 bis 60)	Aux Gas Flussrate (0 bis 30)	Kollisions- energie der Fragmen- tierung (0 bis 40)
		[µA]	[V]	[V]	[V]	[%]	[%]	[%]
1. Segment	loversol	80	42	2	8	50	0	20
	lopamidol	80	45	5	6	45	0	20
	lobitridol	70	40	4	6	55	0	22
	lohexol	44	44	2	6	50	0	21
	lomeprol	44	37	3	5	55	0	22
2. Segment	Amidotrizoesäure	58	32	2	7	50	0	32
	losarkol	46	40	4	6	50	0	26
	lopromid	65	45	2	7	45	0	26
	lothalamicsäure	55	42	2	6	45	0	20
	lopentol	44	35	3	5	55	0	26
	Iodixanol	70	45	4	8	50	0	23

Die in der Tabelle dargestellten optimierten MS-Parameter wurden über die Durchführung des automatischen Tunes sowie des manuellen Tunes erhalten. Dabei wurde vom Programm nacheinander die Intensität des jeweiligen Analyten in

Abhängigkeit variiert Parameter aufgenommen. Der Wert des jeweiligen Parameters mit der größten Intensität des Analyten wurde als Optimum im TuneFile übernommen. Beim manuellen Tune wurde identisch verfahren mit der Ausnahme, dass die Parameter manuell variiert wurden. Die elf Röntgenkontrastmittel ergaben bei allen Parametern nahezu ähnliche Ergebnisse. Es können wenn nur sehr geringfügige Unterschiede gezeigt werden. Auffallend ist die hohe Kollisionsenergie der Amidotrizoesäure. Ursache für die höhere Energie bei der Fragmentierung ist die größere Stabilität des Precursorions. Zur Fragmentierung der Amidotrizoesäure wird, im Gegensatz zu den übrigen 10 RKM, das einfach deiodierte Molekül herangezogen.

Das Ionisierungsverhalten der einzelnen RKM ist sehr unterschiedlich. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse gibt die Tabelle 19 wieder. Neben den zu erwartenden $[M+H]^+$ -Ionen liefert die Ionisierung mit dem ESI-Interface bei einigen Analyten weitere Precursorionen. Drei der iodierten Stoffe erzeugen ausschließlich das $[M+H]^+$ -Ion (Iohexol, Iomeprol und Iopromid). Die sechs Diagnostika Ioversol, Iopamidol, Iobitridol, Iosarkol, Iopentol und Iodixanol liefern bei der Ionisierung zusätzlich Precursor-Ionen mit einer Massendifferenz von $\Delta m/z = 23$ zum Analyt-Molekül. Bei dieser Ionenspezies handelt es sich um das $[M+Na]^+$ -Ion. In den meisten Fällen ist das $[M+H]^+$ -Ion in seiner Intensität stärker als das $[M+Na]^+$ -Ion und wird somit zur Fragmentierung und anschließenden Quantifizierung verwendet. Bei dem RKM Iosarkol wird das $[M+Na]^+$ -Ion zur Fragmentierung/Quantifizierung herangezogen, da es in diesem Fall die stärkste Intensität aufweist (Intensität $[M+H]^+$ -Ion nur 9 %). Das Iodixanol liefert drei Precursor-Ionen. Neben den beiden Ionen $[M+H]^+$ und $[M+Na]^+$ entsteht noch ein Ion mit dem Masse/Ladungsverhältnis von $m/z = 795$. Die Vermutung, dass es sich um das $[M+2 Na]^{2+}$ -Ion oder dem $[M+2 H]^{2+}$ -Ion handelt, kann aufgrund der Massenbilanz nicht gezeigt werden. Es ist eher wahrscheinlich, dass das Molekül Iodixanol während der Ionisierung zusätzlich Energie aufnimmt und zerbricht. In diesem Fall könnte ein Fragmention identifiziert werden. Auffällig zeigt zudem das Precursorion $m/z = 1550$. Mit einer Molmasse von 1550 g/mol müsste das zugehörige $[M+H]^+$ -Ion ein Masse/Ladungsverhältnis von 1551 aufweisen. Dies konnte nicht gezeigt werden. Die Ursache liegt in dem gerätespezifisch hohen FWHM (Full width at half maximum) von 0,5 was eine geringere Auflösung der Spektren bewirkt. Besonders bei hohen Masse/Ladungsverhältnissen kommt die Ungenauigkeit des Gerätes stärker zum tragen.

Die beiden ionischen RKM Amidotrizoesäure und Iothalamicsäure zeigen ein gänzlich anderes Ionen-Spektrum als die nicht-ionischen RKM. Im Gegensatz zu allen anderen liefern die ionischen RKM deiodierte Precursor-Ionen. Beide Substanzen (Amidotrizoesäure und Iothalamicsäure; gleiche Molmasse) zeigen das $[M+H]^+$ -Ion mit dem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) von 615. Zusätzlich entstehen in beiden

Fällen Ionen mit dem m/z von 361. Mit einer negativen Massendifferenz von $\Delta m/z = 254$ (entspricht Verlust von I_2) zum $[M+H]^+$ -Ion handelt es sich vermutlich um das zweifach deiodierte $[M+H]^+$ -Ion. Zusätzlich zeigt die lothalamicsäure ein Ion mit m/z von 487 mit einer Massendifferenz von $\Delta m/z = 128$ (Verlust von HI). Die Amidotrizoesäure liefert noch ein weiteres deiodiertes Ion ($m/z = 233$). Das dreifach deiodierte mit einer $\Delta m/z$ von 382 (Verlust von I_2 und HI). Zur Fragmentierung/Quantifizierung wird für die Amidotrizoesäure das zweifach deiodierte 361-Ion und für die lothalamicsäure das protonierte 615-Ion eingesetzt.

Die Ursache für die höhere Affinität zur Deiodierung liegt in der Struktur der Moleküle. Die nicht-ionischen RKM weisen im Gegensatz zu den ionischen RKM wesentlich größer Alkylreste an den Stellen 1, 3 und 5 auf. Die weniger umfangreichen Alkylreste der ionischen Vertreter bewirken eine geringere Abschirmung der am Ring befindlichen Iodatome (Abbildung 2). Dies könnte zu einer leichteren Abspaltung der Iodatome führen. Zusätzlich wäre bei den ionischen RKM mit der Abspaltung eines Iodatoms eine Ringbildung möglich, welche zu einer Stabilisierung des Moleküls beitragen würde. Da bei dem ionischen RKM eine zweite identische Seitenkette existiert ist noch eine gleich verlaufende Deiodierung denkbar. Das würde die Stabilität des Ions noch weiter erhöhen. Die Abbildung 14 zeigt wie die beiden Precursorionen aussehen könnten. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit bei der Fragmentierung der Amidotrizoesäure nur das zweifach deiodierte Ion ($m/z = 361$) identifiziert werden. Zudem zeigte es eine höhere Stabilität als das $[M+H]^+$ -Ion und wurde somit zur Quantifizierung eingesetzt.

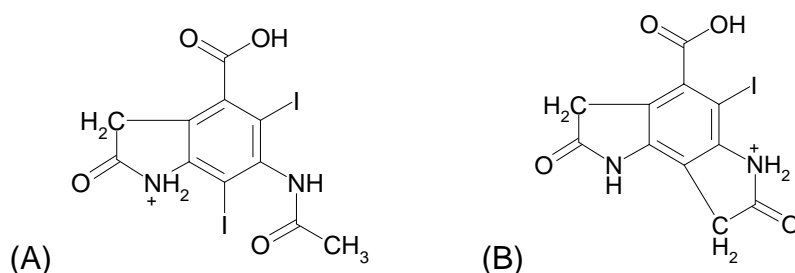


Abbildung 14: Vermutete Strukturformel des einfachen (A) und zweifach (B) deiodierten Precursorions der Amidotrizoesäure

Die lothalamicsäure weist zwar die gleiche Molmasse aber eine andere Struktur auf. Dies führt dazu, dass vermutlich kein trizyklisches System in dieser Form ausgebildet werden kann. Das stabilste Precursorion ist in diesem Fall das $[M+H]^+$ -Ion.

Alle elf untersuchten iodierten RKM lassen sich im ESI-positiv Modus fragmentieren. In den meisten Fällen liefert die Fragmentierung mindestens drei Fragmentationen. Ausnahme sind die RKM lohexol und Amidotrizoesäure mit nur einem und lopentol mit zwei Fragmentationen. Anhand der Massendifferenz zum Precursorion wurden

Molekül-Verluste ermittelt. Die angenommenen Verluste sind in der Tabelle 19 mit aufgeführt. Besondere Aufmerksamkeiten sind den beiden RKM Iopamidol und Iomeprol gewidmet. Mit gleicher Molmasse unterscheiden sie sich lediglich in ihrer Struktur. Da sie annähernd das gleiche Fragmentmuster (gleiche Quantifizierungsmassen) besitzen, ist eine chromatographische Trennung unbedingt erforderlich.

Tabelle 19: Zusammenfassung der Ergebnisse zum Studium des Ionisierungs- und Fragmentierungsverhaltens der einzelnen RKM der 1. Generation.

Substanz	Mol- masse [g/mol]	Massenübergänge (1.Generation)				
		Precursorion (Intensität %)	--> Fragmention(en) (Intensität %)	Fragment- ion [m/z]	Massen- differenz [m/z]	Verlust von
loversol	807	808 (100)	--> 496 (5) / 589 (100) / 790 (50)	589	219	HI, C ₃ H ₉ O ₂ N
				790	18	H ₂ O
		830 (15)	--> 461(29) / 589 (100) / 672 (26)	496	312	k.A.
lopamidol	777			760	18	H ₂ O
		778 (100)	--> 559 (61) / 632 (13) / 687 (17) / 705 (16) / 760 (100)	559	219	HI, C ₃ H ₉ O ₂ N
				687	91	C ₃ H ₉ O ₂ N
		800 (14)	--> 414 (17) / 504 (4) / 581 (4) / 650 (15) / 672 (100)	705	73	C ₃ H ₅ O ₂
lobitridol	835			632	146	HI, H ₂ O
				734	102	C ₄ H ₆ O ₃
		836 (100)	--> 603 (9) / 716 (12) / 734 (100) / 818 (44)	818	18	H ₂ O
		858 (39)	--> 595 (7) / 603 (21) / 682 (11) / 730 (100) / 810 (21)	716	120	H ₂ O, C ₄ H ₆ O ₃
lohexol	821			603	233	HI, C ₄ H ₁₁ O ₂ N
		822 (100)	--> 804 (100)	804	18	H ₂ O
lomeprol	777			687	91	C ₃ H ₉ O ₂ N
		778 (100)	--> 559 (39) / 687 (100) / 705 (12) / 760 (88)	760	18	H ₂ O
				559	219	HI, C ₃ H ₉ O ₂ N
				705	73	k.A.
Amidotrizoe- säure	614	233 (9)	--> k.A.			
		361 (100)	--> 233 (100)	233	128	HI
		615 (22)	--> 361 (100) / 488 (58)			
losarkol	862			708	177	k.A.
		863 (9)	--> 597 (6) / 668 (100) / 845 (73)	757	128	HI
				867	18	H ₂ O
		885 (100)	--> 344 (21) / 708 (100) / 757 (98) / 807 (32) / 867 (86)	807	78	k.A.
lopromid	791			344	541	k.A.
				774	18	H ₂ O
		792 (100)	--> 559 (22) / 573 (32) / 687 (13) / 701 (14) / 774 (100)	573	219	HI, C ₃ H ₉ O ₂ N
				701	91	C ₃ H ₉ O ₂ N
lothalamic- säure	614			559	233	HI, C ₄ H ₁₁ O ₂ N
				687	105	C ₄ H ₁₁ O ₂ N
		361 (16)	--> 233 (100)	487	128	HI
		487 (23)	--> 469 (20) / 359 (100) / 318 (55)	584	31	CH ₅ N
lopentol	835			361	254	2I
		615 (100)	--> 361 (9) / 487 (100) / 558 (5) / 584 (55)	558	57	C ₂ H ₃ NO
lodixanol	1550	836 (100)	--> 818 (100) / 804 (66)	818	18	H ₂ O
		858 (25)	--> 617 (100) / 708 (11) / 730 (18)	804	32	k.A.
lodoxanol	1550	795 (30)	--> 685 (4) / 731 (100)	744	806	k.A.
		1550 (100)	--> 653 (4) / 744 (10) / 1533 (100)	1532	18	H ₂ O
				653	897	k.A.
		1572 (63)	--> 1198 (5) / 1295 (10) / 1317 (23) / 1445 (100)	525	1025	k.A.

k.A.: keine Angabe!

Alle nicht-ionischen RKM erfahren bei der Fragmentierung einen Verlust von einem Molekül H_2O . Die Dehydratisierung erfolgt in hoher Wahrscheinlichkeit an den sekundären Alkoholen (Abbildung 15 B). Sie neigen im Gegensatz zu primären Alkoholen in Gegenwart von Säuren viel stärker zur Bildung von Eliminierungsprodukten. Die Wasserabspaltung wird dadurch erleichtert, dass intermediär auftretende sekundäre oder tertiäre Carbokationen durch die Alkylsubstituenten stabilisiert werden. Eine Ausnahme bildet das Iopamidol. In diesem Fall findet die Eliminierung an einem primären Alkohol statt. Durch eine nucleophile 1,2 Umlagerung könnte ein tertiäres Carbeniumion entstehen, welches eine höhere Stabilität im Gegensatz zu den primären und sekundären Ionen aufweist (Abbildung 16 B und E). Die ionischen RKM erfahren aufgrund ihrer wenigen Hydroxylgruppen keinen Wasserverlust bei der Fragmentierung. In fast allen Fällen werden Abspaltungen von Iodwasserstoff festgestellt. Die Abspaltung von Iodwasserstoff geht vermutlich mit einer Ringbildung einher [29]. Eine Ringbildung verursacht eine Stabilisierung des Ions (Abbildung 15 C, Abbildung 16 C und E). Eine weitere Angriffsmöglichkeit bieten die aliphatischen Seitenketten mit den funktionellen Gruppen. So können Fragmentierungen an den Carboxylgruppen, sowie den Amingruppen stattfinden (Abbildung 15 A und C, Abbildung 16 A, C und D). Hinweise auf Zerstörung des Benzolrings konnten nicht gefunden werden. Für die RKM Iobitridol und Iopamidol wurden die in Abbildung 15 und Abbildung 16 postulierten Fragmente gefunden.

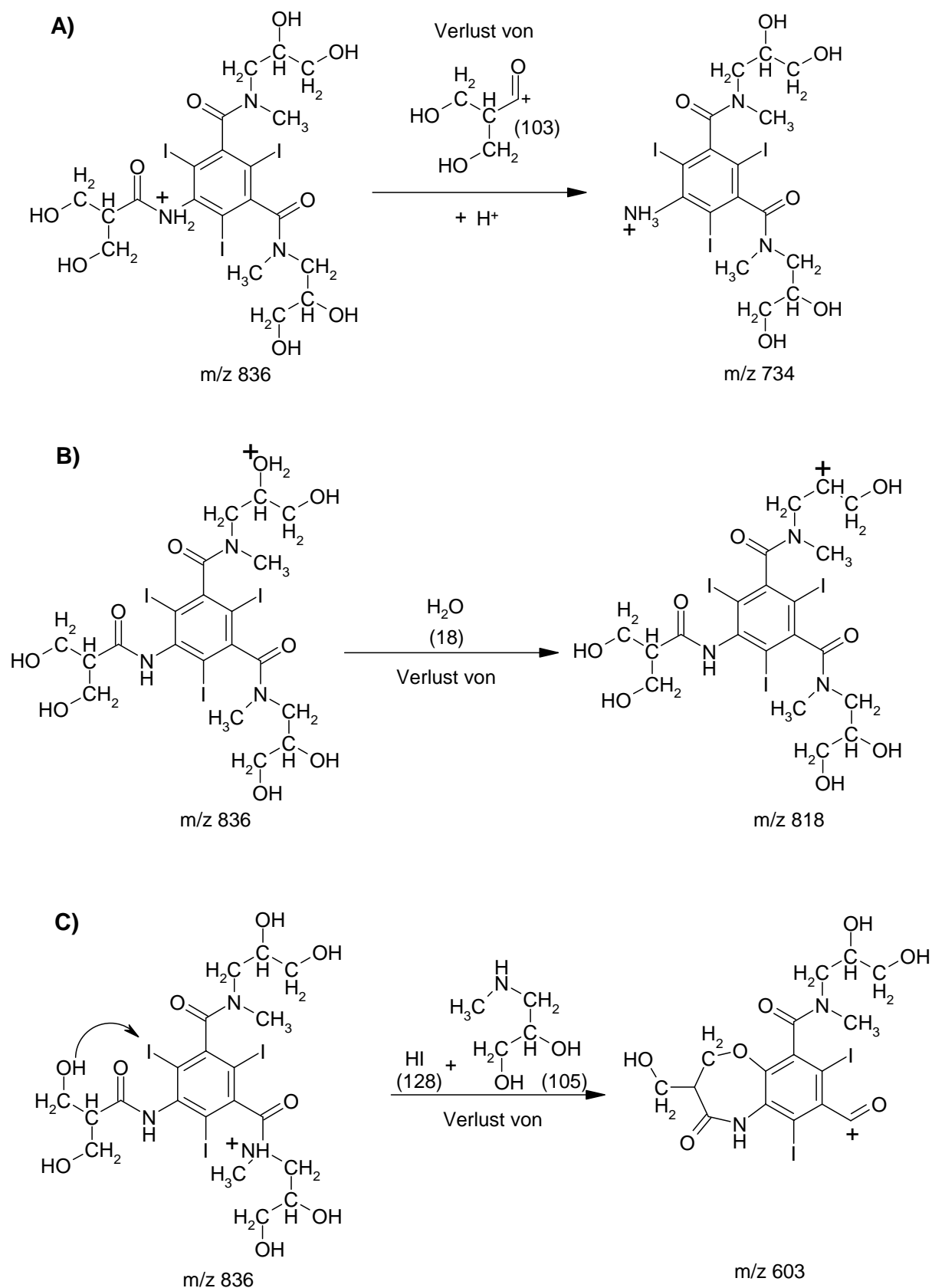


Abbildung 15: Vorschlag zur Fragmentierung des Precursorions $[\text{M}+\text{H}]^+$ von lobitridol.

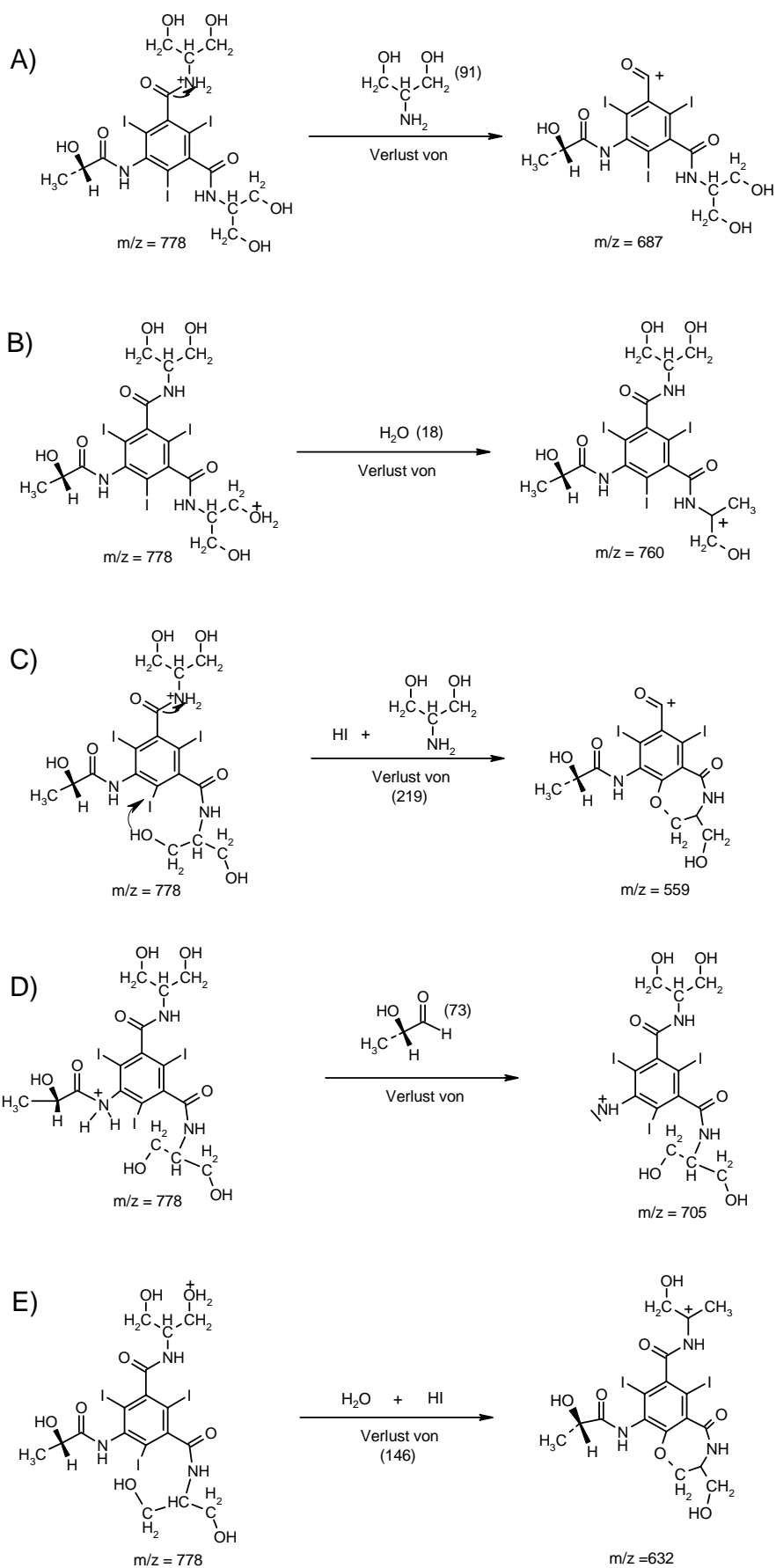


Abbildung 16: Vorschlag zur Fragmentierung des Precursorions $[M+H]^+$ von Iopamidol

Die Fragmentierung einiger Ionen der 1. Generation führte ebenfalls zu einer Vielzahl von Fragmenten 2. Generation. Neben der Eliminierung findet vorrangig, wie schon bei der Fragmentierung der Precursorionen, die Deiodierung und Wassereeliminierung statt. Aber auch Fragmentierungsreaktionen an den aliphatischen Seitenketten. Es konnten keine Hinweise auf eine Zerstörung des Benzolrings gefunden werden. Das Fragmentierungsmuster ist in der Tabelle 20 wiedergegeben.

Tabelle 20: Zusammenfassung der Ergebnisse zum Studium des Fragmentierungsverhalten der einzelnen RKM der 2. Generation.

Substanz	Massenübergänge (1.Generation)		Massenübergänge (2.Generation)	
	Precursorion (Intensität %) --> Fragment(en) (Intensität %)		Precursor-Ion (Intensität %) --> Fragment-Ion(en) (Intensität %)	
	[m/z]		[m/z]	
loversol	808 (100) --> 496 (5) / 589 (100) / 790 (50)		589 --> 387 (4) / 433 (68) / 461 (100) / 498 (15) / 571 (42)	
			790 --> 443 (20) / 571 (60) / 641 (25) / 662 (100) / 760 (38)	
lopamidol	778 (100) --> 559 (21) / 632 (4) / 687 (19) / 705 (13) / 760 (100)		496 --> k.A.	
			760 --> 487 (5) / 588 (4) / 632 (100) / 687 (6)	
			559 --> 387 (31) / 414 (100) / 431 (79) / 497 (62)	
			687 --> 532 (5) / 542 (100) / 559 (20) / 643 (6) / 687 (11)	
			705 --> 577 (20) / 632 (5) / 650 (100) / 687 (26)	
lobitridol	836 (100) --> 603 (9) / 716 (12) / 734 (100) / 818 (44)		632 --> k.A.	
			734 --> 480 (7) / 606 (1) / 629 (33) / 716 (100)	
			818 --> 690 (100)	
			716 --> k.A.	
lohexol	822 (100) --> 804 (100)		603 --> 475 (100) / 516 (7) / 555 (4) / 585 (7)	
			804 --> k.A.	
lomeprol	778 (100) --> 559 (39) / 687 (100) / 705 (12) / 760 (88)		687 --> 405 (11) / 532 (100) / 559 (7)	
			760 --> k.A.	
			559 --> 277 (100) / 431 (74) / 486 (95)	
			705 --> k.A.	
Amidotrizoe-säure	361 (100) --> 233 (100)		233 --> 148 (100) / 192 (80)	
losarkol	885 (100) --> 344 (21) / 708 (100) / 757 (98) / 807 (32) / 867 (86)		708 --> k.A.	
			757 --> k.A.	
			867 --> k.A.	
			807 --> k.A.	
lopromid	792 (100) --> 559 (15) / 573 (20) / 687 (13) / 701 (16) / 774 (100)		344 --> k.A.	
			774 --> 559 (5) / 646 (100)	
			573 --> 414 (45) / 445 (100)	
			701 --> k.A.	
lothalamis-säure	615 (100) --> 361 (9) / 487 (100) / 558 (5) / 584 (55)		559 --> 400 (24) / 431 (100) / 527 (20)	
			687 --> k.A.	
			487 --> 430 (99) / 456 (62) / 469 (100)	
			584 --> k.A.	
lopentol	836 (100) --> 818 (100) / 804 (66)		361 --> 177 (100) / 233 (5) / 330 (9)	
			558 --> k.A.	
			818 --> 511 (12) / 602 (51) / 653 (20) / 730 (100) / 744 (60)	
lodixanol	1550 (100) --> 525 (7) / 653 (71) / 744 (100) / 1532 (72)		804 --> 529 (11) / 627 (100) / 657 (35) / 700 (25) / 718 (53)	
			744 --> 653 (100) / 726 (10)	
			1532 --> 653 (50) / 744 (100)	
			653 --> k.A.	
			525 --> k.A.	

k.A.: keine Angabe!

Für die Erstellung der in dieser Arbeit verwendeten MS-Methode, für elf zum Teil gleichzeitig eluierender Substanzen, ist die Angabe über deren Retentionszeit unentbehrlich. Aufgrund der im Kapitel 7.2 ermittelten Retentionszeiten der Analyten wurde die MS-Methode in zwei Segmente eingeteilt. In jedem Segment kann nur ein Tune-file festgelegt werden. Somit wurde aus den im Vorfeld optimierten Tunefiles der in einem Segment zusammengefassten RKM (Tabelle 18) ein Tunefile erstellt, der einen Kompromiss dessen darstellt. Die Tabelle 21 gibt einen Überblick über die Parameter der verwendeten zwei Tunefiles.

Tabelle 21: MS-Parameter für die Bestimmung der Röntgenkontrastmittel der zwei eingesetzten Tunefiles.

anliegende Stromstärke des Sprays	Spannung der beheizten Kapillare	Spannung am ersten Octapol	Spannung am zweiten Octapol	Sheath Gas Flussrate	Aux Gas Flussrate
[μ A]	[V]	[V]	[V]	[%]	[%]
1. Tunefile (Segment 1 / 7.74 Minuten)					
60	40	3	6	50	0
2. Tunefile (Segment 2 / 27.26 Minuten)					
44	44	2	6	50	0

Die komplette Scanzeit beider Segmente beträgt 35 Minuten. Ein Segment ist wiederum in mehrere (maximal fünf) scan events eingeteilt. In einem Segment werden während der gewählten Scanzeit alle scan events im Wechsel durchlaufen und zwar innerhalb von Millisekunden. In dem scan event werden die zu fragmentierenden Precursorionen, die dafür notwendigen Kollisionsenergien und der Ionisierungs-Modus (positiv oder negativ) festgelegt. Auch die Art der Detektion wird hier bestimmt. Bei allen untersuchten Substanzen wird eine SRM (selected reaction monitoring)-Detektion durchgeführt.

7.2 Optimierung der chromatographischen Trennung

Das chromatographische Verhalten der iodierten RKM wurde zunächst an vier unterschiedlichen HPLC-Säulen (Discovery, Luna, Gemini, Synergi-Polar) unter gleichen Bedingungen untersucht. Die Bedingungen sind im Kapitel 6.4 genannt. Für die Bewertung sind die Retentionszeiten (RT) der einzelnen Arzneistoffe herangezogen worden. Die Totzeit jeder Säule wurde mit dem organischen Salz Chlormequat bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 22 wiedergegeben.

Tabelle 22: Retentionszeit (RT) in Minuten der untersuchten RKM mittels HPLC-MS in Abhängigkeit von der verwendeten Trennsäule und Laufmittelzusammensetzung

Arzneistoff	Discovery HS C18		Luna		Synergi-Polar		Gemini	
	Retentionszeit		Retentionszeit		Retentionszeit		Retentionszeit	
	5/95 MeOH/H ₂ O	10/90 MeOH/H ₂ O	5/95 MeOH/H ₂ O	10/90 MeOH/H ₂ O	5/95 MeOH/H ₂ O	10/90 MeOH/H ₂ O	5/95 MeOH/H ₂ O	10/90 MeOH/H ₂ O
Totzeit	1,2		1,5		2,1		1,5	
loversol	1,5	1,4	3,0	2,1	2,5	2,4	3,3	2,2
lopamidol	1,5	1,5	3,1	2,3	2,5	2,4	3,5	2,5
lobitridol	1,5	1,5	5,9	2,9	2,5	2,5	4,5 - 6,4	2,8
lohexol	1,5	1,5	4,9	2,9	2,5	2,4	5,4	3
lomeprol	1,6	1,5	5,3	3,1	2,5	2,4	5,7	3,1
Amidotrizoesäure	1,6	1,8	7,7	5,2	2,5	2,5	10,4	6,2
losarkol	1,5	1,5	10,8 + 13,0	5,1 + 5,6	2,5	2,5	11,1 + 13,5	4,9 + 5,4
lopromid	1,5	1,5	10,5 + 11,9	4,9 + 5,4	2,5	2,4	12,2 + 13,9	5,1 + 5,6
lothalamicsäure	1,6	1,8	8,7	5,9	2,5	2,5	10,5	6,9
lopentol	1,5	1,5	17,1	7,2	2,6	2,4	17,4	6,9
lodixanol	1,4	1,3	-	10,7 - 17,1	2,5	2,4	-	11,6 - 17,1

Die HPLC-Säule Discovery zeigt keine nennenswerte Retention der untersuchten Stoffe. Auch die Synergi Polar mit polarem Endcapping und Ether gebrückten Phenylrest, die besonders für die Trennung polarer Analyten geeignet ist, weist keine Trennung auf. Alle RKM eluieren aufgrund der hohen Polarität und der damit einhergehenden guten Wasserlöslichkeit nahezu mit der Totzeit. Diese Erkenntnis deutet bereits darauf hin, dass eine Anreicherung der Analyten aus den wässrigen Proben, mittels Festphasenextraktion an RP-Materialien oder Flüssig/Flüssig-Extraktion, erschwert sein könnte. Die HPLC-Säule Luna und Gemini weisen hingegen ein etwas besseres Trennverhalten auf. Ursache für das bessere Trennverhalten der beiden C-18 Säulen könnte die kleinere Partikelgröße der Füllmaterialien sein. Durch eine Verringerung der Partikelgröße erhöht sich die Trennstufenzahl und somit die Effizienz einer Säule. Der erste Analyt loversol eluiert nach der zweifachen Totzeit. Die Retentionszeiten beider Säulen liegen zwischen 3 und 17 Minuten.

Je höher der Methanol-Anteil im Laufmittel ist, umso früher werden die Analyten eluiert. Die HPLC-Säule Gemini zeigt eine bessere Trennung im „Mittelfeld“ zwischen 5 und 10 Minuten. Große signifikante Unterschiede zwischen den beiden Säulen sind den Herstellerangaben (Tabelle 6) der untersuchten Säulen nicht zu entnehmen.

Daher ist es schwierig die Ursache für das bessere Trennverhalten der Gemini zu klären.

Die ermittelten Retentionszeiten der Analyten zeigen, dass bei den verwendeten isokratischen Systemen nicht immer eine vollständige Trennung erreicht wurde. Obwohl koeluierende Substanzen in den seltensten Fällen ein Problem bei Verwendung eines Massenspektrometers als Detektor darstellen, wurde die chromatographische Trennung noch weiter optimiert. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass die Peakbreite bei dem Iodixanol sehr hoch ausfiel. Der Stoff eluierte über einer Dauer von etwa 6 Minuten. Es wurden verschiedene HPLC-Gradienten studiert. Dabei zeigte sich, dass der Anfangsgradient einen sehr hohen Wasseranteil aufweisen muss, um eine bessere Auftrennung der sehr polaren Diagnostika gewährleisten zu können. Insbesondere die Trennung von Iopamidol und Iomeprol ist notwendig, da sie sich nicht in ihrem Precursorion und daraus entstehenden Fragmenten, sondern lediglich in ihrer Struktur unterscheiden. Um eine bessere Peaksymmetrie des Iodixanols erzielen zu können, wurde der Gradient nach 12 Minuten auf 100 % Methanol erhöht. Chromatographisch auffallend sind die drei RKM Iobitridol, Iopromid und Iosarkol. Die Peaks weisen zwei Maxima auf. Ursache ist die Struktur der Substanzen. Bei acht der untersuchten Stoffe (Iobitridol, Iohexol, Iomeprol, Iosarkol, Iopromid, Ioversol, Iopentol und Iodixanol) sind zwei oder mehr chirale C-Atome im jeweiligen Molekül vorhanden, welche Diastereomere bilden. Die Diastereomeren-Paare weisen mehr oder weniger starke Unterschiede in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften auf und können unter optimalen Bedingungen mittels HPLC getrennt werden [30, 12]. Das in der Arbeit angewandte Gradientenprogramm ist in der Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Tabellarische Darstellung des optimierten Gradienten für die Trennung der iodierten Röntgenkontrastmittel.

Laufmittel	Zeit [min]					
	0	12	20	25	29	35
A: Wasser/Methanol (95/5 Vol.-%) + 0,5 Vol.-% Ameisensäure	100 %	100 %	0 %	0 %	100 %	100 %
B: Methanol + 0,5 Vol.-% Ameisensäure	0 %	0 %	100 %	100 %	0 %	0 %

Zusätzlich wurde der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration des Laufmittels (LM) auf die chromatographische Trennung untersucht. Zur Auswahl standen nur organische Säuren, da anorganische Säuren zur Salzbildungen neigen und zu starken Verstopfungen im Massenspektrometer führen. Für die Versuche in dieser Arbeit wurde statt Essigsäure Ameisensäure verwendet, da diese eine höhere Säurestärke aufweist. Eine Auswirkung auf die Peaksymmetrie konnte nicht festgestellt werden. Einen Einfluss auf die Signal-Intensität hingegen konnte sehr deutlich gezeigt werden. In der folgenden Abbildung 17 ist die Abhängigkeit bildlich dargestellt. Die zugehörigen Daten sind dem Anhang Kapitel 9.1.1 zu entnehmen. Je höher die Ameisensäurekonzentration im LM desto größer ist das Signal des Analyten. Eine Erhöhung der Protonen im Eluenten erhöht die Anzahl der vorhanden protonierten Precursor-Ionen, was zu einer Erhöhung der Signalintensität führt. Um eine Korrosion an Stahlittings, Kapillaren sowie zahlreichen metallischen Bauteilen des Massenspektrometers zu vermeiden, wurde auf eine Konzentration > 0,5 % Ameisensäure verzichtet.

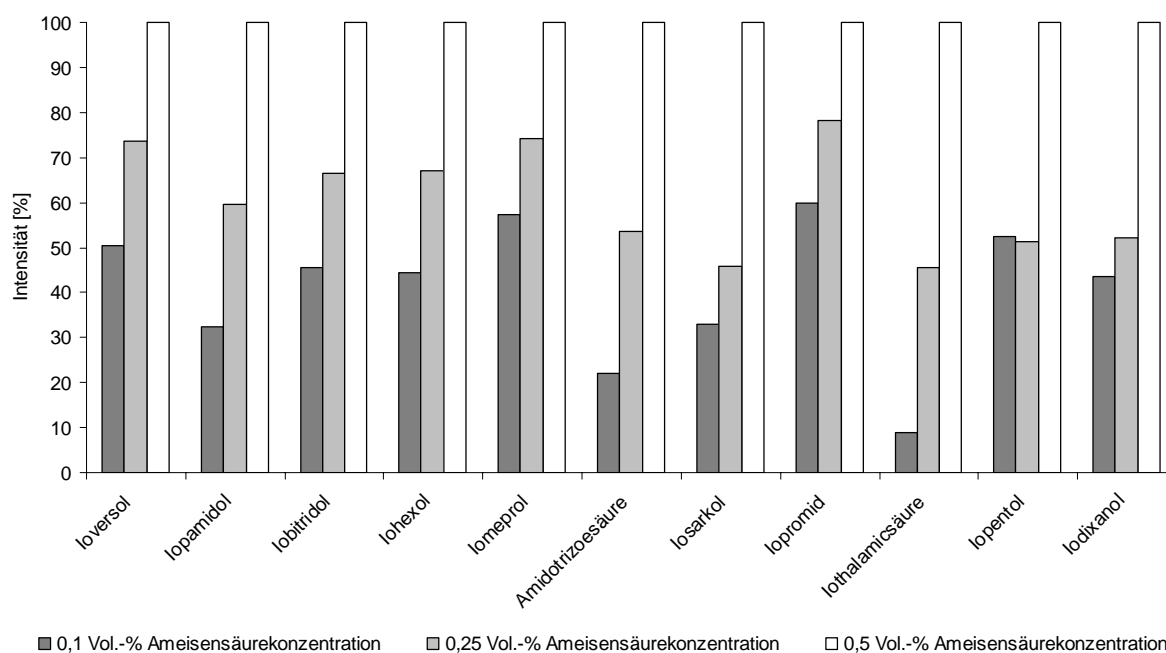


Abbildung 17: Einfluss der Ameisensäurekonzentration des Laufmittels auf die Signalintensität der Analyten. Die Ergebnisse der Signalintensitäten der Analyten mit der Konzentration von 0,5 % Ameisensäure im LM wurden auf 100 % normiert

Ebenso wurde der Einfluss des Lösungsmittels der zu injizierenden Probe auf die Peaksymmetrie der Analyten überprüft. Die Variation der Lösungsmittelzusammensetzung Methanol und Wasser zeigt, dass ein höherer Wasser-Anteil von Vorteil ist. Die besten Peaksymmetrien wurden mit einer rein wässrigen Lösung erzielt. Einen

Anteil von 10 Vol.-% Methanol im Laufmittel führte schon zu einem Verlust der Auflösung, sodass vorher gut angetrennte Analyten keine Trennung mehr zeigten. Die Peaks wurden zudem breit und unsymmetrisch. In der folgenden Abbildung 18 ist das Total-Ionenstrom Chromatogramm (TIC) der elf iodierten Röntgenkontrastmittel unter optimierten chromatographischen Bedingungen dargestellt.

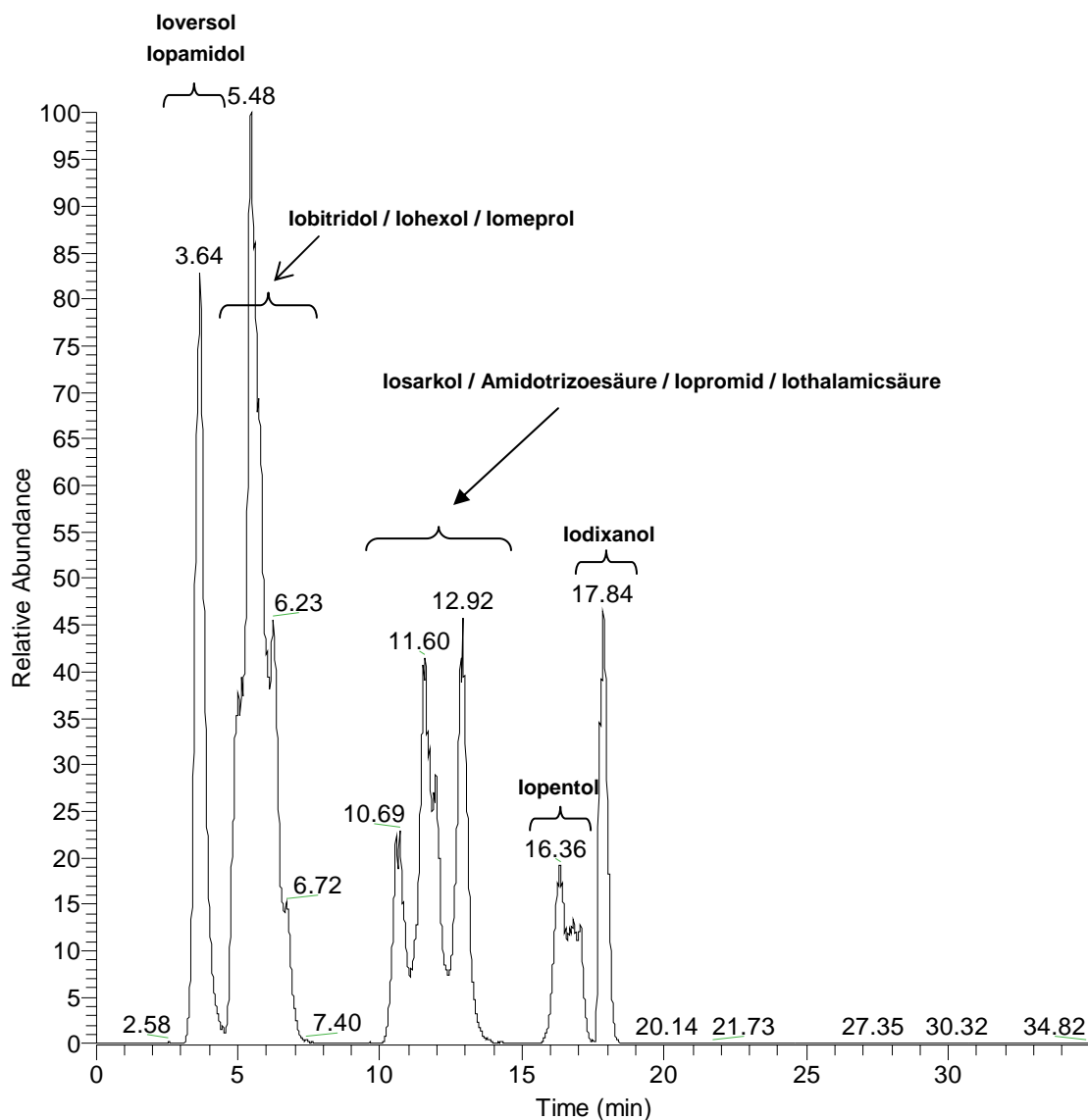


Abbildung 18: Total-Ionenstrom Chromatogramm (TIC) der elf in dieser Arbeit untersuchten iodierten Röntgenkontrastmittel.

Die Abbildung 19 zeigt die dazugehörigen Massenspektren der untersuchten Stoffe.

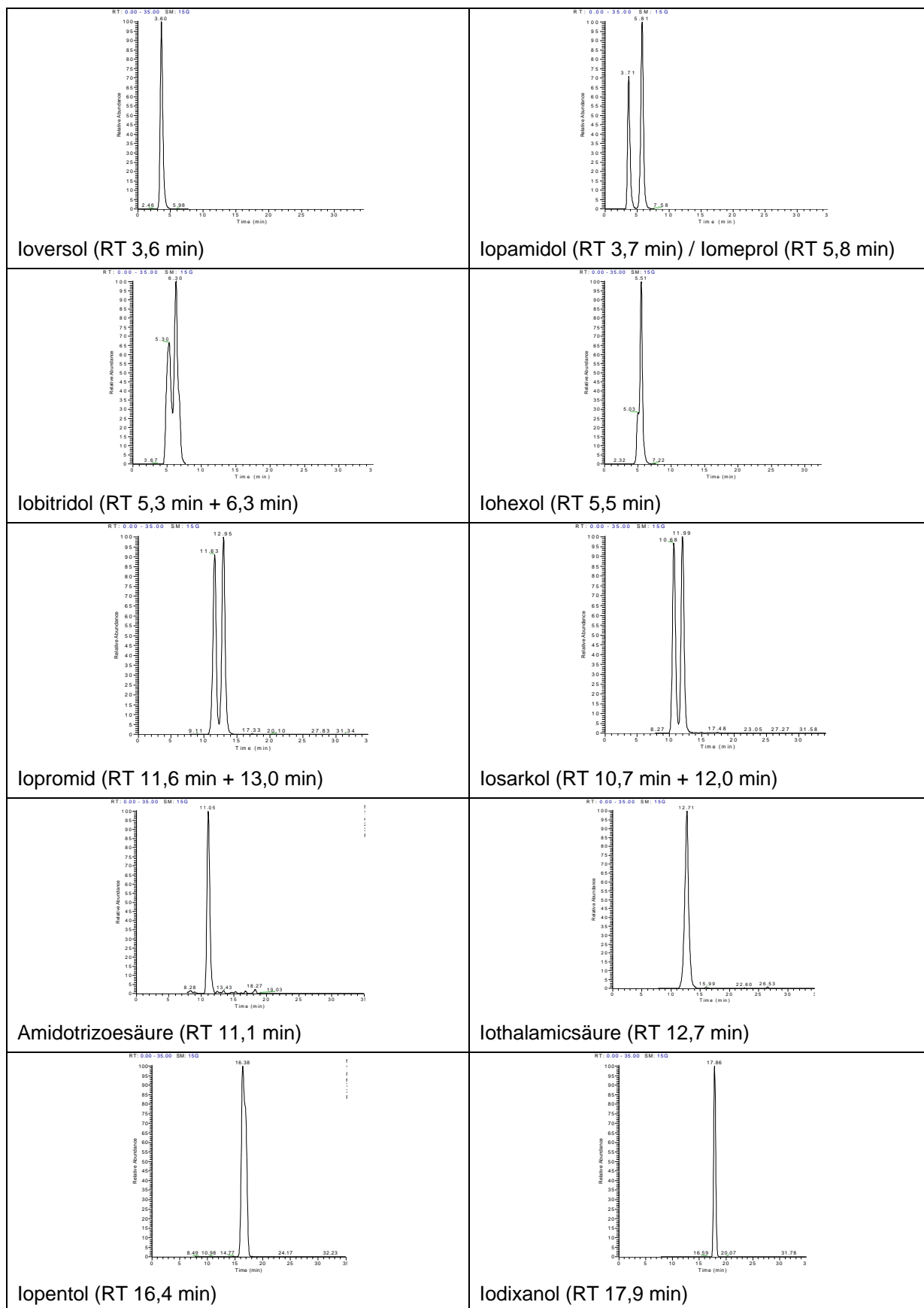


Abbildung 19: Chromatogramm der einzelnen Massenspuren der untersuchten Analyten unter optimierten chromatographischen Bedingungen

Im ersten Segment eluieren die Röntgenkontrastmittel Ioversol gefolgt von Iopamidol, Iobitridol, Iohexol und Iomeprol. Im zweiten Segment werden die Stoffe Amidotrizoesäure, Iosarkol, Iopromid, Iothalamicsäure, Iopentol und Iodixanol detektiert.

Um eine hohe Empfindlichkeit der Analysenverfahren erreichen zu können, wurde das Injektionsvolumen schrittweise auf 200 µl erhöht. Eine Verschlechterung der Peaksymmetrie konnte bei keinem Analyt festgestellt werden.

7.3 Untersuchung von Harn induzierten Matrixeffekten

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von Harn-Inhaltsstoffen auf die Signalintensität der Analyten überprüft werden. Die Durchführung dieser Versuche ist in Kapitel 6.5 beschrieben. Zur Auswahl kamen die drei anorganischen Salze NaCl, KHSO₄ und KH₂PO₄, sowie die drei organischen Substanzen Harnstoff, Kreatinin und Citronensäure. Zur besseren Übersicht werden alle Ergebnisse in einer Graphik schematisch zusammengefasst. Eine detaillierte Übersicht in tabellarischer Form ist in Kapitel 9.1.2 bis 9.1.7 zu entnehmen.

Anorganische Harn-Inhaltsstoffe

Die Abbildung 20 zeigt den Einfluss der NaCl-Konzentration auf die Stärke der Signalintensität der Analyten.

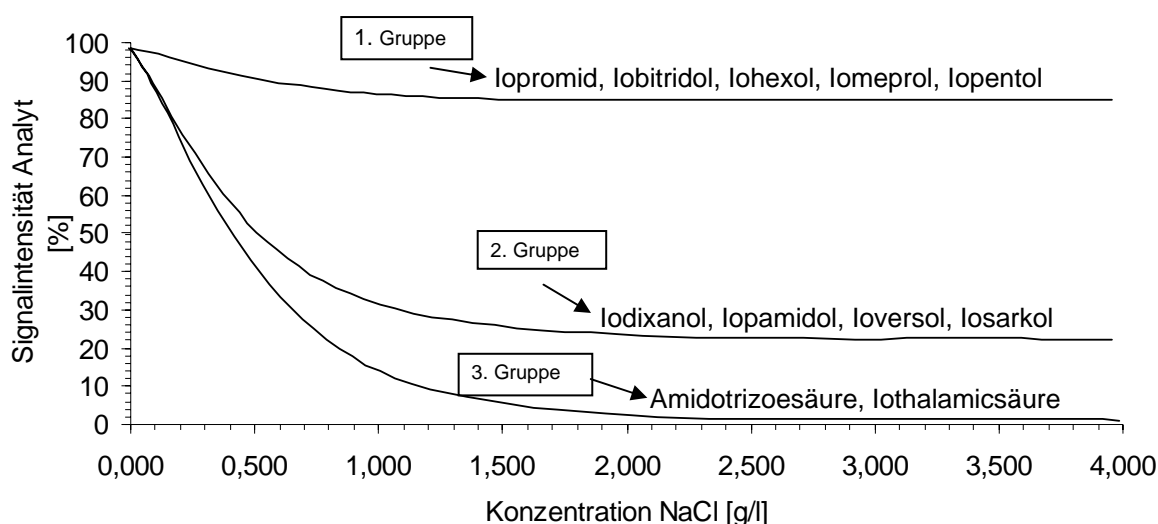


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Signalverlustes der Analyten in Abhängigkeit von der Konzentration des anorganischen Harn-Inhaltsstoffs NaCl.

Die Signalintensität der Analyten Iopromid, Iobitridol, Iohexol, Iomeprol und Iopentol (1. Gruppe) wird in Gegenwart des Salzes NaCl nur geringfügig beeinflusst. Mit

Werten um ca. 90 bis 100 % Wiederfindung liegt der Verlust im Bereich der methodischen Schwankungen. Im Gegensatz dazu erfahren die sechs übrigen RKM (2. Gruppe und 3. Gruppe) eine stärkere Signalunterdrückung. Die 2. Gruppe zeigt Signalverluste um etwa 70 %. Die 3. Gruppe, die ausschließlich aus den ionischen RKM besteht, erfährt die stärkste Unterdrückung. Schon bei Konzentrationen oberhalb 2 g/l NaCl ist kein Signal mehr vorhanden.

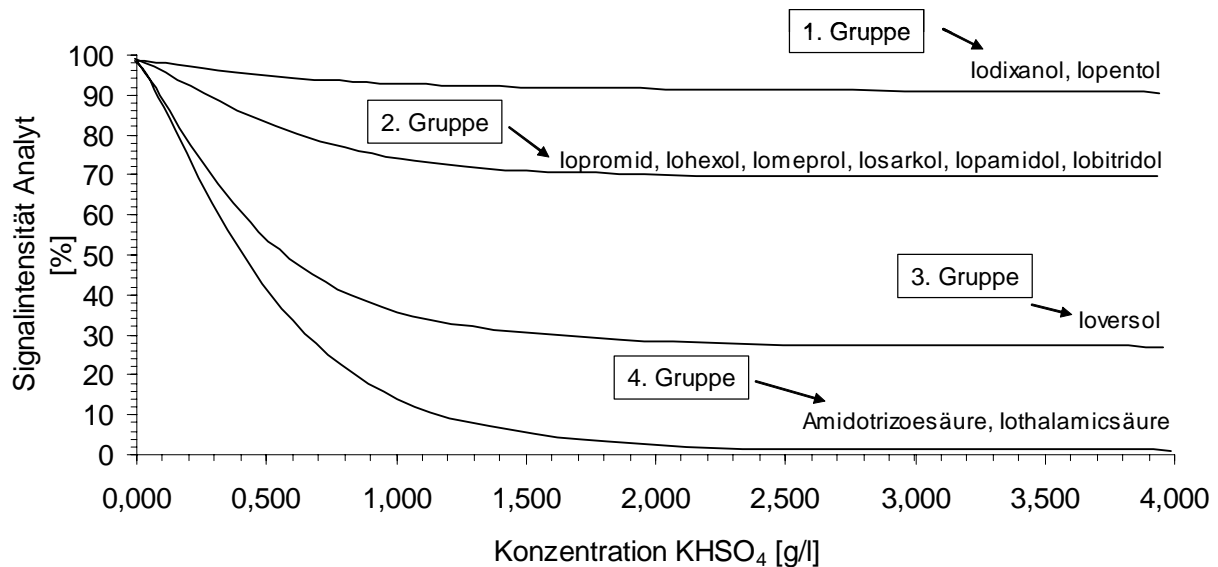


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Signalverlustes der Analyten in Abhängigkeit von der Konzentration des anorganischen Harn-Inhaltsstoffs KHSO₄.

Die beiden anorganischen Salze KHSO₄ und KH₂PO₄ haben einen etwas anderen Einfluss auf die Signalintensität der Analyten. Wie die Abbildung 21 und Abbildung 22 zeigen kann man die RKM in vier Gruppen einteilen. Während die erste Gruppe (Iodixanol und Iopentol) keinen Einfluss auf die Salzkonzentration beider Salze hat, zeigen alle übrigen RKM eine Signalunterdrückung. Den stärksten Einfluss haben die beiden studierten Salze auf das Signal der ionischen RKM (Amidotrizoesäure, Iothalamicsäure). Wie auch schon beim NaCl konnten bei Salzkonzentrationen oberhalb 1,5 g/l keine Signale mehr detektiert werden. Ioversol zeigte ebenfalls eine starke Signalunterdrückung. Die Verluste lagen bei KHSO₄ mit etwa 70 % sehr hoch. Das Salz KH₂PO₄ verursachte einen Rückgang des Signals von Ioversol und Iopamidol auf etwa 40 %. Die restlichen RKM, die in der Gruppe 2 zusammengefasst sind, erfahren nur einen geringen Einfluss. Der Verlust liegt bei etwa 20 bis 30 %

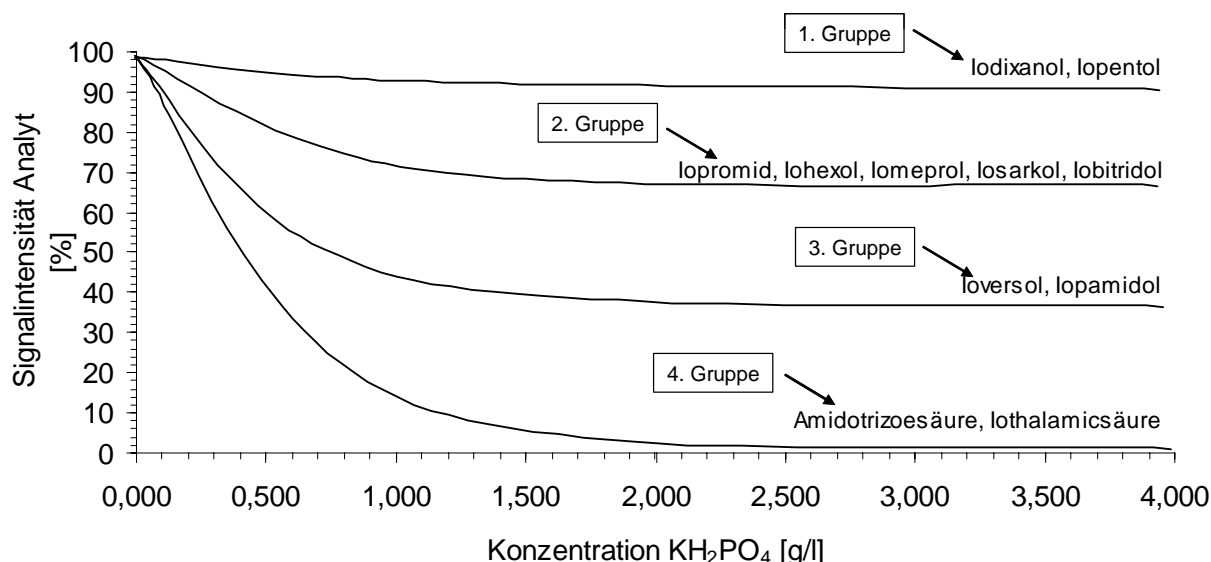


Abbildung 22: Schematische Darstellung des Signalverlustes der Analyten in Abhängigkeit von der Konzentration des anorganischen Harn-Inhaltsstoffs KH_2PO_4 .

Betrachtet man die drei Abbildungen (Abbildung 20 bis Abbildung 22) zusammen, so erkennt man deutlich, dass die ionischen RKM am stärksten von den anorganischen Salzen beeinflusst werden. Die anorganischen Harn-Inhaltsstoffe bewirken eine totale Unterdrückung der Signale, obwohl die Maximalkonzentrationen der Inhaltsstoffe des Harns mit 4 g/l noch nicht erreicht sind. Ursache für dieses Verhalten könnte in der Struktur der Moleküle liegen. Im Gegensatz zu den nicht-ionischen RKM besitzen die ionischen RKM eine kleinere Molekülgröße. Darüber hinaus haben sie keine stark verzweigten aliphatischen Seitenketten. Dies bewirkt eine größere Mobilität, die zu einer höheren Konkurrenzsituation um die nur begrenzt vorliegenden Oberflächenladungen der sich bildenden Tropfen bei der Elektrosprayionisierung führt. Im Gegensatz zu den neutralen nicht-ionischen Diagnostika liegen die ionischen RKM als Salze vor. Sie besitzen somit ein ähnliches elektrostatisches Verhalten wie die anorganischen Salze. Dies könnte ebenfalls dazu beitragen, dass die ionischen RKM stärker durch anorganische Salze beeinflusst werden als die übrigen nicht-ionischen.

Eine weitere Ursache für das ungleiche Verhalten der einzelnen Diagnostika liegt in deren unterschiedlichen Retention an der HPLC-Säule. Die Abbildung 23 zeigt neben einem Chromatogramm der elf RKM auch die Retentionskurven der einzelnen anorganischen Salze von der HPLC-Säule. Die Vorgehensweise zur Aufnahme der Retentionskurven ist in Kapitel 6.5 beschrieben. Der Vergleich der Retentionszeiten der RKM mit den Kurven der anorganischen Salze (zeitliche Aufzeichnung der Salzfracht) zeigt deutlich welche iodierten Diagnostika in die Zone starker Signalunterdrückung liegen und somit stärker beeinflusst werden. Die Stoffe Ioversol und

Iopamidol zum Beispiel müssten eine stärkere Signalunterdrückung erfahren, da sie gleichzeitig mit den Salzen von der Säule eluieren. Betrachtet man die Abbildung 20 bis Abbildung 22 so ist gerade dies (abgesehen von den ionischen RKM) der Fall. Die einzige Ausnahme zeigt das Iopamidol beim KHSO_4 . Dort zeigt das RKM eine weniger starke Signalunterdrückung. Die Diagnostika, die am weitesten von der Zone starker Signalunterdrückung entfernt sind, wie zum Beispiel Iodixanol und Iopentol, erfahren die geringste Signalunterdrückung. Auch das konnte in den meisten Fällen gezeigt werden.

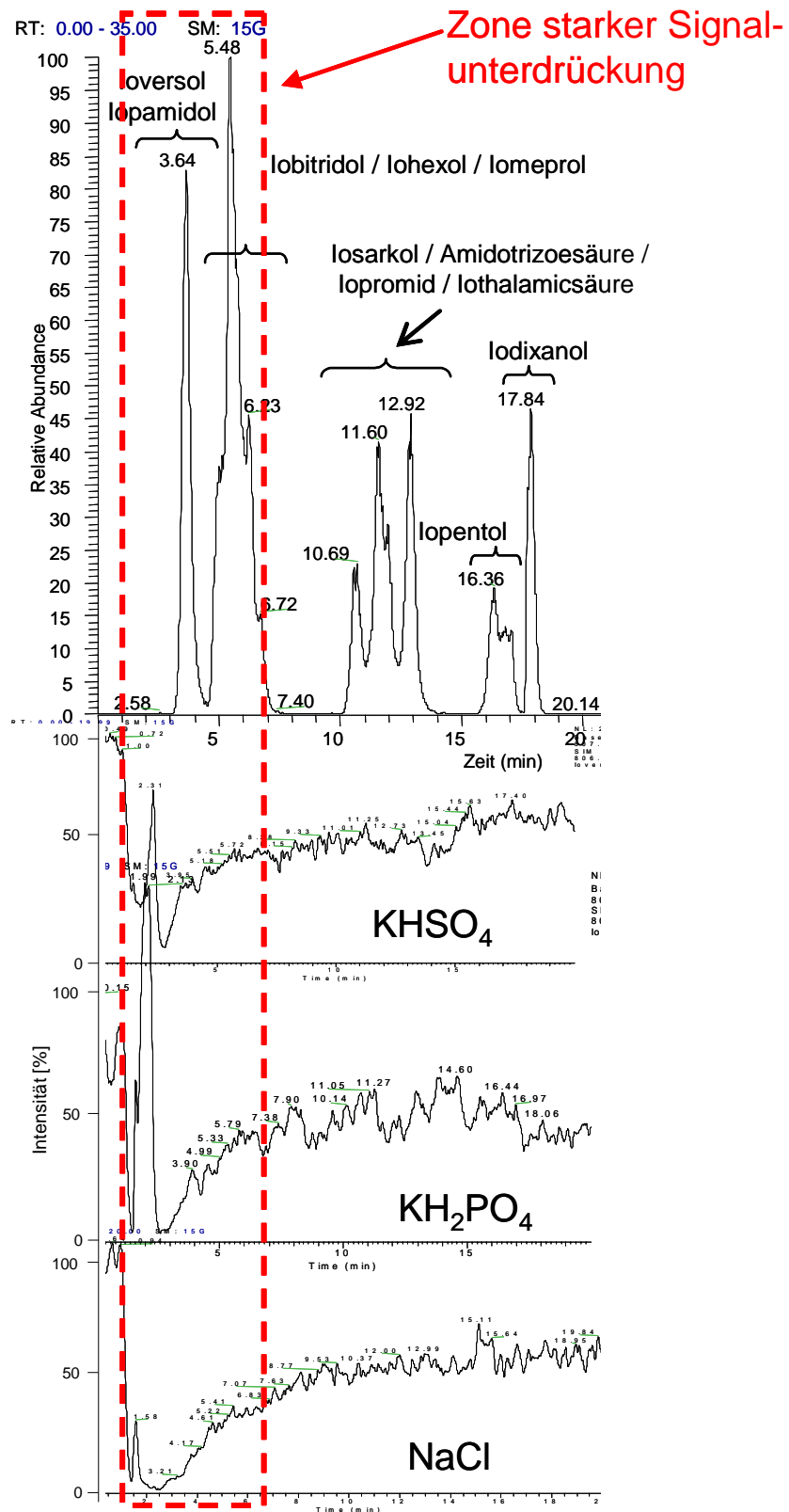


Abbildung 23:

Vergleich der Retentionszeiten der iodierten RKM mit den Retentionskurven der anorganischen Harn-Inhaltsstoffe.

Organische Harn-Inhaltsstoffe

Die Abbildung 24 zeigt die Abhängigkeit der Signalunterdrückung der einzelnen Analyten von der Kreatininkonzentration. Außer lobitridol, losarkol und loversol (2. Gruppe), die einen Verlust von max. 20 % erfahren, zeigen keine der übrigen untersuchten Diagnostika eine Unterdrückung der Signalintensität. Das ist nicht weiter verwunderlich. Auch im Fall der organischen Harn-Inhaltsstoffe wurde ein Vergleich der Retentionszeiten der iodierten RKM mit den Retentionskurven der organischen Harn-Inhaltsstoffe durchgeführt (Abbildung 27). Man kann deutlich erkennen, dass Kreatinin nahezu über das komplette Chromatogramm keine Signalunterdrückung hervorruft. Lediglich am Anfang und am Ende des Chromatogramms erfährt der Analyt einen Einbruch in seiner Signalintensität. Die Signalunterdrückung zum Zeitpunkt der Totzeit der Säule ist bei der Elution der ersten RKM schon wieder angestiegen. Ursache liegt zum einen in dem gewählten niedrigen Konzentrationsbereich. Oberhalb 1,5 mg/l wurden keine Daten aufgenommen, da im 24-Stunden Harn mit keinen höheren Konzentrationen zu rechnen ist. Ein weiterer Grund ist die Tatsache, dass es sich bei Kreatinin um ein neutrales Molekül handelt. Es wird nur geringfügig dissoziieren. Somit stellt es nur bedingt eine Konkurrenz für die betrachteten Analyten während des Ionisierungsvorgangs dar.

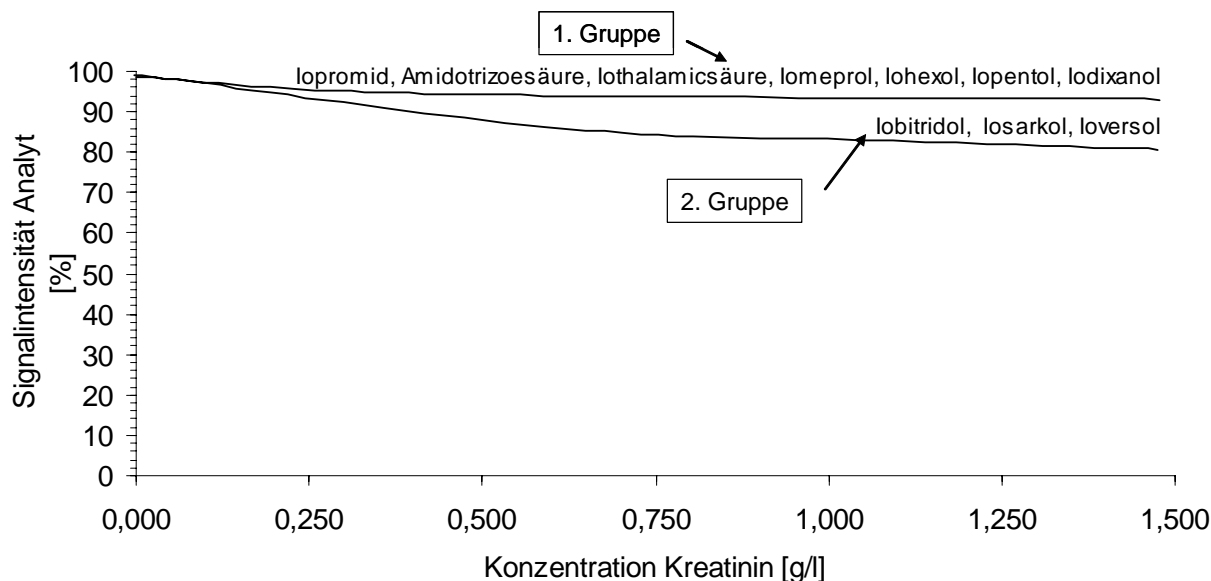


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Signalverlustes der Analyten in Abhängigkeit von der Konzentration des organischen Harn-Inhaltsstoffs Kreatinin.

Der Harn-Inhaltsstoff Citronensäure zeigt im Gegensatz zum Kreatinin einen etwas stärkeren Einfluss. Hier kann man deutlich eine Einteilung in drei Gruppen vornehmen. Am stärksten beeinflusst werden die beiden RKM loversol und lopamidol.

loversol und lopamidol eluieren von allen RKM als erstes von der HPLC-Säule. Betrachtet man die Abbildung 27 so erkennt man, dass die Citronensäure eine größere Zone starker Signalunterdrückung verursacht. Da es sich um eine organische Säure handelt, ist vermutlich ein größerer Einfluss auf die elektrostatischen Wechselwirkungen während der Ionisierung trotz des geringen Konzentrationsbereichs gegeben.

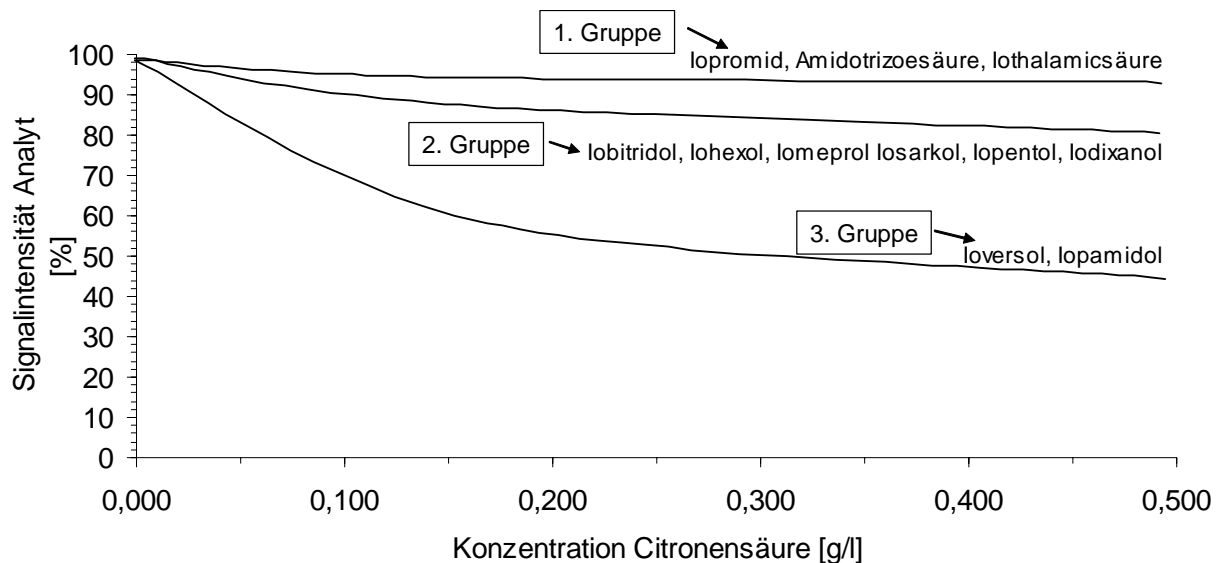


Abbildung 25: Schematische Darstellung des Signalverlustes der Analyten in Abhängigkeit von der Konzentration des organischen Harn-Inhaltsstoffs Citronensäure.

Der Harnstoff zeigt, im Gegensatz zu den übrigen beiden organischen Harn-Inhaltsstoffen, eine andere Abhängigkeit. In diesem Fall ist eine Einteilung in vier Gruppen möglich. Die 1. Gruppe, die lediglich aus lodixanol besteht, hat keinen nennenswerten Einfluss auf die Harnstoffkonzentration. Die drei weiteren Gruppen liegen zwischen 15 und 55 % der Signalintensität. Wobei losarkol und lopentol am geringsten und lopamidol am stärksten beeinflusst wird.

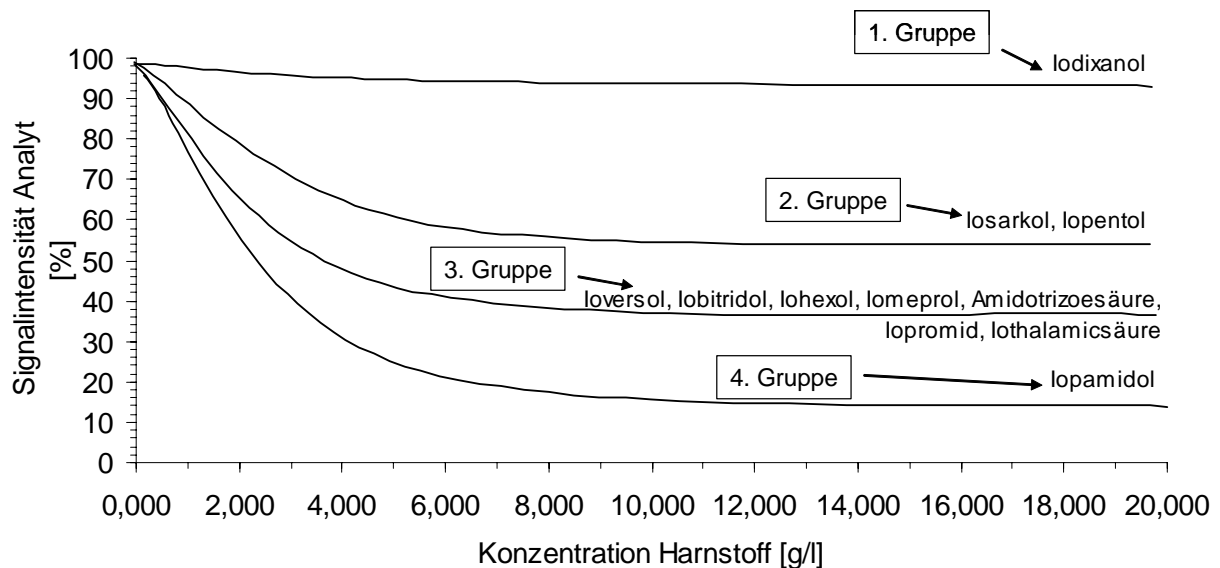
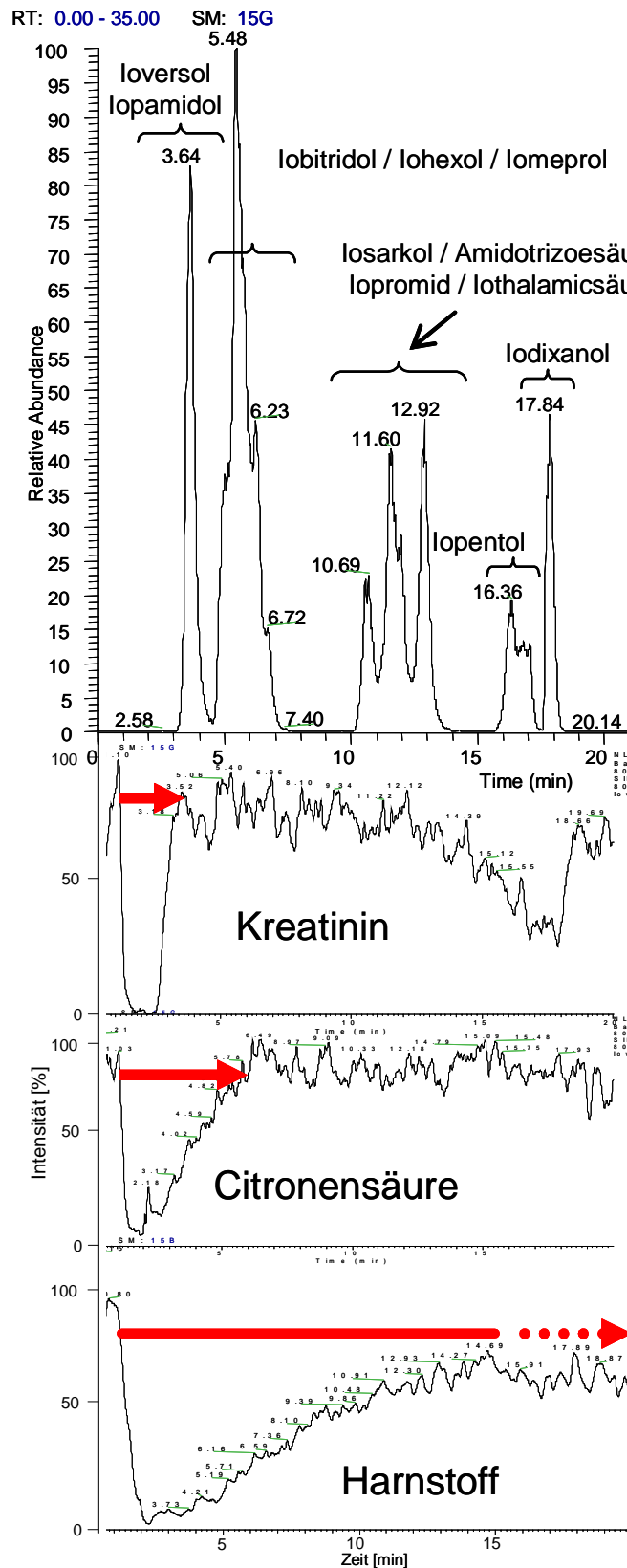


Abbildung 26: Schematische Darstellung des Signalverlustes der Analyten in Abhängigkeit von der Konzentration des organischen Harn-Inhaltsstoffs Harnstoff.

Betrachtet man in Abbildung 27 die Retentionskurve von Harnstoff, so ist es nicht verwunderlich, dass eine starke Abhängigkeit während der Versuche zu beobachten war. Harnstoff zeigt von allen drei organischen Inhaltsstoffen den größten Einfluss auf die Höhe des Signals. Nahezu über den kompletten Retentionsbereich der RKM verursacht der Harnstoff eine starke Unterdrückung. Ursache ist zum einen der hohe Gehalt, der im Versuch verwendet wurde. Im 24-Stunden-Harn ist mit einer maximalen Konzentration von 20 g/l zu rechnen. Zudem ist Harnstoff ein Molekül, das aufgrund seiner beiden Amingruppen gut protoniert werden kann und somit Einfluss auf die Protonierung und somit Ionisierung der RKM hat.



→ Zone starker Signalunterdrückung

Abbildung 27: Vergleich der Retentionszeiten der iodierten RKM mit den Retentionskurven der anorganischen Harn-Inhaltsstoffe.

Harn-Substitut

In der Abbildung 28 ist die Retentionskurve bei Verwendung des Harn-Substituts (c = 24-Stunden Harn) dargestellt. Man erkennt deutlich, dass das Signal des Analyten zum Zeitpunkt der Totzeit der Säule abfällt und dann im Verlauf so gut wie gar nicht mehr ansteigt. Die Kombination aller Inhaltsstoffe und die hohe Konzentration, besonders die der anorganischen Salze, verursachen eine totale und auch stetige Signalunterdrückung.

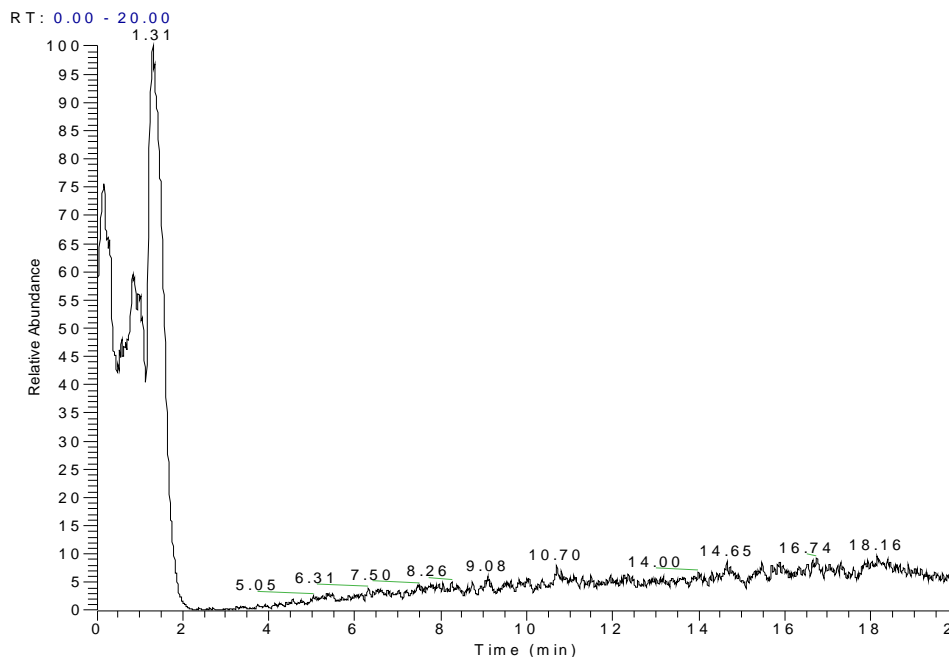


Abbildung 28: Retentionskurve des Harn-Substituts.

Zusammenfassung: Signalunterdrückung anorganische und organische Harn-Inhaltsstoffe

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die anorganischen Salze eine stärkere Auswirkung auf das Signal der Analyten haben als die organischen Inhaltsstoffe des Harns. Grund ist die geringere Konkurrenzsituation der organischen Harn-Inhaltsstoffe um die nur begrenzt vorliegenden Oberflächenladungen der sich bildenden Tropfen bei der Elektrosprayionisierung, da sie im wässrigen Laufmittel nicht so stark dissoziiert vorliegen als die anorganischen Salze. Die anorganischen Salze zeigen hingegen im wässrigen Eluenten vollständige Dissoziation zu den entsprechenden Anionen und Kationen. Das positiv geladene Natriumion zum Beispiel steht in Konkurrenz zum jeweiligen Analyten um die nur begrenzt vorliegenden Oberflächenladungen.

Die Abbildung 29 A zeigt das Massenspektrum des RKM Ioversol mit dem Precursor-Ion von $m/z = 808$ ($c = 4$ g/l). Die Abbildung 29 B zeigt das Massenspektrum von 1 g/l NaCl-Lösung. In der Abbildung C ist das RKM Ioversol mit NaCl zusammen injiziert worden. Dabei konnte beobachtet werden, dass das Massenspektrum vom NaCl deutlich überwiegt. Das Precursor-Ion vom Ioversol ist nicht mehr zu erkennen. Die gewählte Konzentration der NaCl-Lösung lag mit 1 g/l noch deutlich unter der Konzentration im 24-Stunden-Harn von 20 g/l.

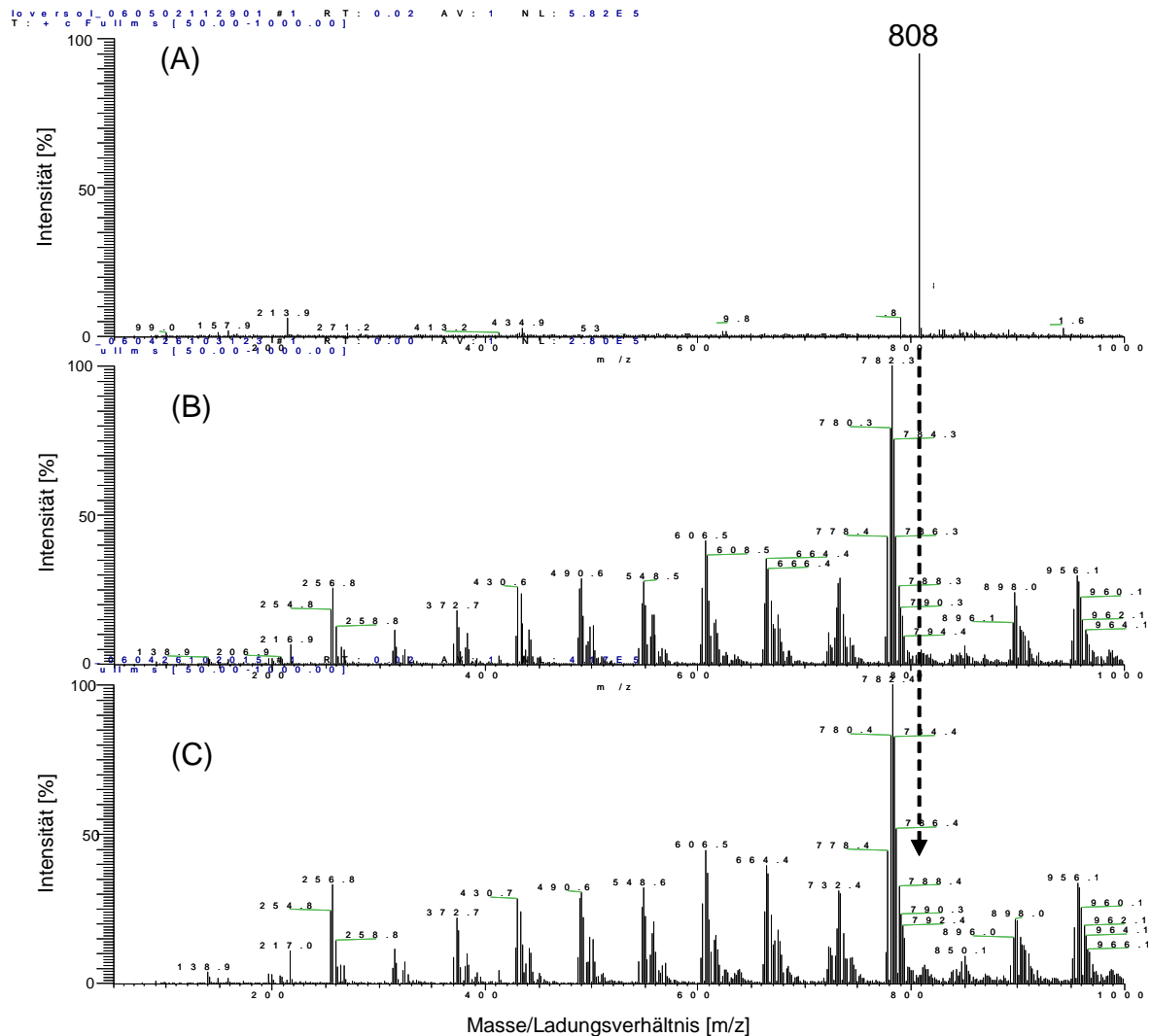


Abbildung 29: Massenspektrum der Analyten Ioversol (A) [$c = 4$ g/l], NaCl (B) [$c = 1$ g/l] und die Kombination aus beiden Analyten (C) [c (Ioversol) = 4 g/l; c (NaCl) = 1 g/l].

Zusätzlich kann festgehalten werden, dass die ionischen RKM von den anorganischen Salzen am stärksten in ihrer Intensität beeinflusst werden. Die anorganischen Harn-Inhaltsstoffe bewirken eine totale Unterdrückung der Signale, obwohl

die maximalen Konzentrationen des 24-Stunden Harns bei weitem noch nicht erreicht sind. Ursache ist der Salzcharakter der ionischen RKM. Sie besitzen vermutlich ein ähnliches elektrostatisches Verhalten wie die anorganischen Salze und erfahren somit eine stärkere Konkurrenz im Bezug darauf. Die organischen Inhaltsstoffe zeigen hingegen kaum oder zumindest nicht auffallend mehr Einfluss auf die ionischen Diagnostika als auf die nicht-ionischen.

Die Beobachtung, dass bei Injektion des Harn-Substituts die Basislinie des Analyten stark abfällt (Abbildung 28) und im Laufe von 20 Minuten nicht wieder ansteigt, ist ebenfalls noch ein wichtiger Punkt. Insbesondere im Bezug auf die Entwicklung eines Analysenverfahrens zur Bestimmung von iodierten RKM in stark matrixbehafteten wässrigen Proben. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass eine optimierte Probenvorbereitung, gerade bei matrixbehafteten Proben, unabdingbar zu sein scheint.

In der Abbildung 30 wurde die Wiederfindung der Analyten in Harn-Substitut und in originalem Harn mit einer Bezugslösung (Wasser) gleicher Analyt-Konzentration verglichen. Während die ionischen RKM erwartungsgemäß keine Wiederfindungen zeigen, liegen auch die übrigen untersuchten RKM unterhalb 1 % Wiederfindung. Dies bestätigt in eindrucksvoller Weise die in Abbildung 28 beobachtete Signalunterdrückung. Allerdings kann auch gezeigt werden, dass die Wiederfindung der Analyten im originalen Harn geringer ausfällt als die ohnehin schon niedrige Wiederfindung im Harn-Substitut. Dies lässt vermuten, dass die Unterdrückung des Analyt-Signals nicht nur von den in dieser Arbeit untersuchten sechs Harn-Inhaltsstoffen abhängig zu sein scheint, sondern auch von weiteren Inhaltsstoffen. Weitere Versuche zur Klärung dieses Sachverhalts werden in Kapitel 6.6.2.2 durchgeführt.

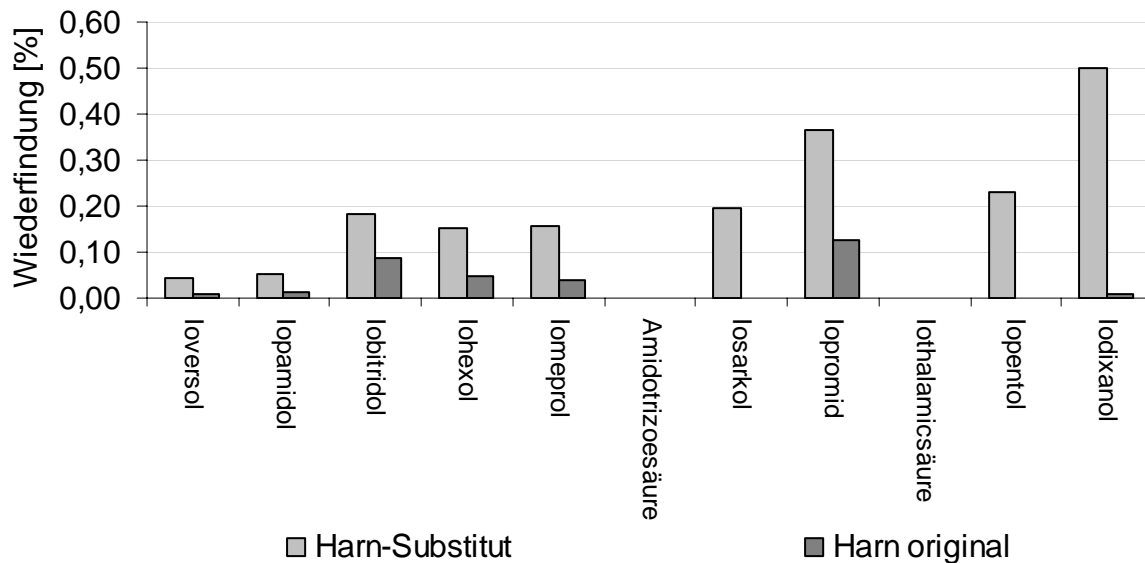


Abbildung 30: Wiederfindung der Analyten im Harn und im Harn-Substitut bezogen auf die Signalintensitäten der Analyten in einer Bezugslösung. Die Konzentration betrug bei allen untersuchten Lösungen 1 mg/l.

Zusätzlich kann man daraus schlussfolgern, dass eine Auswertung von matrix-behafteten Proben über eine externe Kalibrierfunktion, erstellt durch Bezugslösungen aus Harn-Substitut, nicht geeignet ist. Erst ab einer Verdünnung von etwa 1/1000, wie Abbildung 31 zeigt, ist es möglich, eine Auswertung über eine externe Kalibrierfunktion durchzuführen. Allerdings müssen die RKM, da sie ebenfalls mit verdünnt werden, in sehr hohen Konzentrationen in der Lösung enthalten sein, um sie noch detektieren zu können.

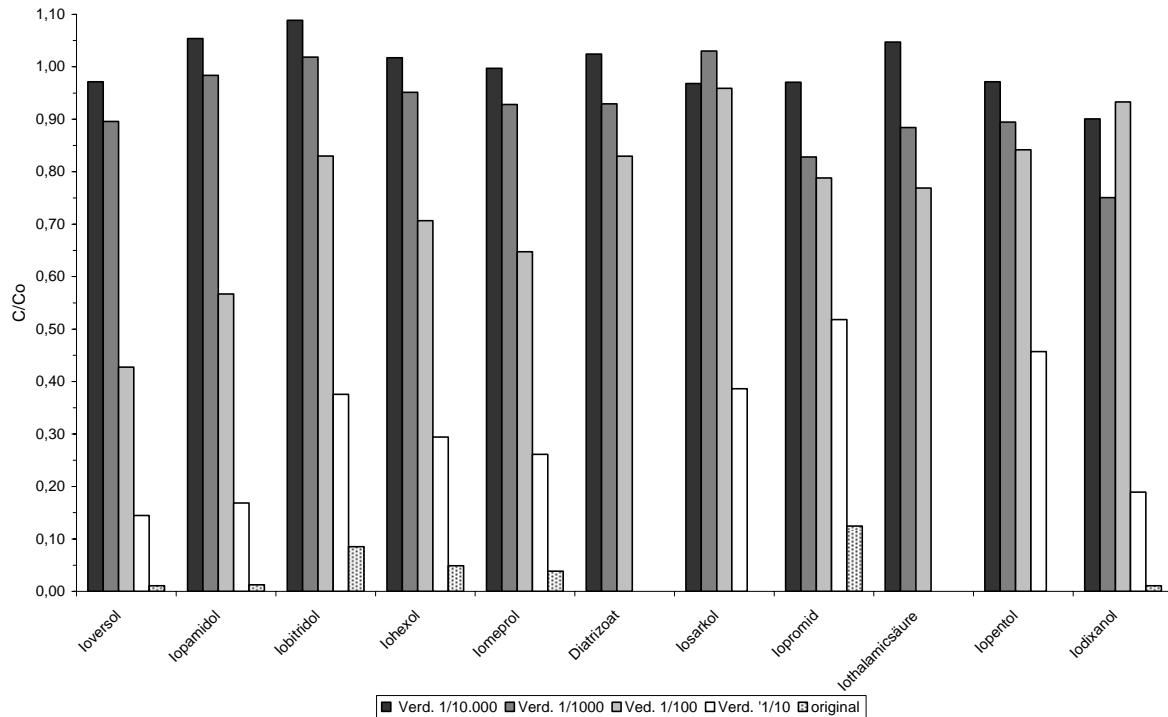


Abbildung 31: Graphische Darstellung der Signalveränderung bei Verwendung des originalen Harns.

Alle Ergebnisse die in diesem Kapitel erzielt wurden, zeigen wie unabdingbar eine Probenvorbereitung gerade bei matrixbehafteten Proben zu sein scheint. Um ein sicheres und zudem noch empfindliches Analysenverfahren erarbeiten zu können, ist eine Abtrennung der Analyten von den störenden Komponenten und eine Anreicherung der Analyten aus der Probe unverzichtbar. Das folgende Kapitel 7.4 befasst sich mit dieser Thematik.

7.4 Probenvorbereitung

7.4.1 Flüssig/Flüssig-Extraktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von organischen Lösungsmitteln auf deren Eignung zur Anreicherung der Analyten aus wässrigen Proben untersucht. Die Wasserproben wurden anlehnend an der Literatur einheitlich auf pH 3 angesäuert. Folgende Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische kamen zum Einsatz:

- Ethylacetat
- Dichlormethan-2-Propanol (3:1)
- Cyclohexan
- Ethylacetat-2-Propanol (3:1)
- Cyclohexan-2-Propanol (3:1)

Die Durchführung ist im Detail in Kapitel 6.6.1 beschrieben. Trotz der Kombination mit dem relativ polaren Lösungsmittel 2-Propanol konnten keine Analyten angereichert werden. Sie verblieben ausnahmslos in der Wasserprobe. Ursache hierfür ist die sehr gute Wasserlöslichkeit und die starke Polarität der Analyten. Aufgrund der hier beschriebenen Befunde wurde die Flüssig/Flüssig-Extraktion im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

7.4.2 Festphasen-Extraktion

In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse zur Optimierung der Probenvorbereitung beschrieben und diskutiert. Als erstes wurde ein Verfahren für matrixarme wässrige Proben entwickelt. Im Anschluss daran soll durch die Weiterentwicklung des erarbeiteten Verfahrens, in Kombination mit weiteren Techniken, der Nachweis dieser Wirkstoffe auch in schwieriger Matrix ermöglicht werden.

7.4.2.1 Matrixarme wässrige Proben

In Vorversuchen wurde zunächst eine Vielzahl von SPE-Kartuschen, gefüllt mit unterschiedlichen Sorbentien diverser Hersteller, auf deren Eignung zur Anreicherung der iodierten RKM studiert. Eine komplette Liste der untersuchten Festphasen, inklusive Dimension, mittlerer Porengröße und spezifischer Oberfläche, ist der Tabelle 10 auf Seite 30 zu entnehmen. Die Anreicherung erfolgte nach dem in Abbildung 11 beschriebenen Verfahren, mit Ausnahme der NH_2 -Kartusche. In diesem Fall wurde statt 1 Liter Wasserprobe nur 10 ml einer Bezugslösung über die Kartusche gegeben. Dem Elutionsmittel wurden 4 Vol.-% Ammoniak-Lösung (25 %ig) zugefügt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 24 dargestellt.

Die Untersuchungen ergaben, dass besonders die auf Polystyrol-Divinylbenzol (SDB) basierenden Adsorberharze (Easy und ENV+) und die modifizierten Octadecyl-Kieselgel-Phasen (C18-Hydra und Tetracyclin) zur Anreicherung der iodierten RKM geeignet sind. Die Wiederfindungsraten bei diesen Festphasen lagen in der Regel für die nicht-ionischen RKM zwischen 40 und 114 %. Die Wiederfindungen für die ionischen RKM waren um einiges niedriger. Sie erreichten für die Amidotrizoesäure maximal 42 % und für die Iothalamidsäure maximal 52 %. Reine C 18-Phasen, die einen stark ausgeprägten unpolaren Charakter besitzen, scheinen weniger gut geeignet zu sein. Die Versuche lassen eher vermuten, dass eine gewisse polare Modifizierung des Adsorbens notwendig ist, um eine zufrieden stellende Anreicherung zu erreichen. Ursache ist die hohe Polarität der iodierten Röntgenkontrastmittel. Aufgrund dieser Polarität überwiegen bei der Anreicherung weniger die unpolaren Wechselwirkungen über van-der-Waals-Kräfte sondern vielmehr die polaren Wechselwirkungen. Dazu zählen Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol/Dipol- und π - π -Wechselwirkungen. Die iodierten RKM besitzen eine Vielzahl von Hydroxyl-, Amino- und Carbonylgruppen, die für die polaren Wechselwirkungen verantwortlich sind. Aber auch der aromatische Ring trägt zu den polaren Wechselwirkungen bei. Für die Anreicherung an den beiden Octadecyl-Kieselgel Phasen (C18-Hydra und Tetracyclin) sind vermutlich die Hydroxylgruppen der iodierten Diagnostika verantwortlich. Sie interagieren mit den noch freien Hydroxylgruppen des Kieselgels (nicht endcapped). Bei den beiden Polystyrol-Divinylbenzol (SDB) Copolymerphasen tragen die Amino- und Carbonylgruppen sowie der aromatische Ring der RKM zur Anreicherung bei. Die Adsorption kommt über π - π -Wechselwirkungen mit den π -Bindungen der Vinylgruppe und des Benzolrings der Festphase zustande. Es ist aber auch eine Wechselwirkung zwischen den Hydroxylgruppen der untersuchten Stoffe mit den Restsilanolgruppen des Kieselgels denkbar.

Ferner ist aus den Versuchen zu entnehmen, dass die ionischen RKM (Amidotrizoesäure und Iothalamidsäure) von allen RKM die geringsten Anreicherungsraten besitzen. Ursache ist vermutlich der ionische Charakter, der eine besonders hohe Wasserlöslichkeit bewirkt. Zudem besitzen die ionischen Vertreter keine Hydroxylgruppen. Das erklärt vermutlich auch, warum sie weniger gut an der C18-Hydra-Phase adsorbieren. Bei ionischen Analyten werden Festphasen basierend auf Ionentauscher empfohlen. Der Anreicherungsversuch mit der NH₂-Kartusche, einem schwachen Anionenaustauscher, zeigte hohe Wiederfindungsraten der ionischen Diagnostika. Allerdings fielen die Wiederfindungen für die restlichen RKM sehr niedrig aus.

Tabelle 24: Ergebnisse zum Studium unterschiedlicher SPE-Kartuschen auf deren Tauglichkeit iodidierte RKM anzureichern.

RKM	Easy	Strata X	Oasis HLB	ENV+	Drug	Tetracyclin	C18 Hydra	Carbon (200mg)	Carbon (1000mg)	NH ₂ ¹⁾
	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=3)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=6)	(n=1)
	WDF [%]	WDF [%]	WDF [%]	WDF [%]	WDF [%]	WDF [%]	WDF [%]	WDF [%]	WDF [%]	WDF [%]
loversol	39	14	4	69	5	65	94	27	5	16
lopamidol	34	11	3	64	4	37	56	36	3	23
lobitridol	63	65	13	72	28	79	92	41	6	24
lohexol	49	38	7	65	14	73	80	36	5	21
lomeprol	61	70	9	63	13	72	86	43	10	22
Amidotrizoesäure	17	17	2	42	6	41	28	36	40	137
losarkol	73	76	38	110	111	90	114	36	10	15
lopromid	93	92	29	87	70	83	90	43	8	25
lothalamicsäure	15	16	4	47	5	52	34	n.B.	21	147
lopentol	84	90	28	68	104	76	99	30	2	16
Iodixanol	53	89	43	80	109	99	107	4	< BG	21

¹⁾ Elutionsmittel MeOH/Acetonitril + 4 Vol.-% NH₄OH-Lösung (25 %ige)

n.B. = nicht bestimmt!

WDF = Wiederfindung

Betrachtet man die Ergebnisse der Wiederfindungsraten aller untersuchten Festphasen genauer, insbesondere für die ionischen RKM, so stellt die ENV+ den besten Kompromiss dar. Die Wiederfindungsraten der ionischen RKM liegen bei etwa 45 % und die übrigen weisen WDF zwischen 63 und 110 % auf.

Um eine genaue Aussage darüber treffen zu können, ob die Ursache der zum Teil geringen Wiederfindungsraten durch schlechte Adsorption an der Festphase oder aber durch eine nur schwache Elution der Analyten von der Kartusche verursacht wird, wurden für alle zehn ausgewählten SPE-Kartuschen Durchbruchtests durchgeführt. Die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 6.6.2.1 beschrieben. Die Ergebnisse der Versuche einiger ausgewählter Festphasen sind in Tabelle 25 aufgelistet. Dabei ist zu beachten, dass die Ergebnisse nur als Anhaltspunkte verwendet werden können, da keine Überprüfung des Verfahrens (hintereinander geschaltete Festphasen) auf dessen Reproduzierbarkeit und Genauigkeit durchgeführt wurde. Trotz allem zeigen die Tests aufschlussreiche Ergebnisse. Die Wiederfindungsraten der RKM auf den Polystyrol-Divinylbenzol (SDB) Phasen (Easy und ENV+) sowie den Octadecyl-Kieselgel-Phasen (C18-Hydra, Tetracyclin und Drug) resultieren aus einer geringen Anreicherung. Dies konnte auch als Ursache für die schlechten WDF der nicht-ionischen RKM an der NH₂-Kartusche gezeigt werden.

Tabelle 25: Ergebnisse zum Studium des Durchbruchs unterschiedlicher SPE-Kartuschen.

RKM	ENV+		Easy		Tetracyclin		C 18 Hydra		NH ₂ ¹⁾		Carbon (1000mg)	
	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=2)
		Durchbruch [%]		Durchbruch [%]		Durchbruch [%]		Durchbruch [%]		Durchbruch [%]		Durchbruch [%]
Ioversol	69	25	39	27	65	44	94	15	16	89	5	< BG
Iopamidol	64	26	34	28	37	60	56	54	23	99	3	< BG
Iobitridol	72	17	63	19	79	< BG	92	< BG	24	89	6	< BG
Iohexol	65	22	49	24	73	< BG	80	< BG	21	103	5	< BG
Iomeprol	63	11	61	22	72	< BG	86	< BG	22	95	10	< BG
Amidotrizoesäure	42	31	17	60	41	39	28	73	137	< BG	40	< BG
Iosarkol	110	4	73	9	90	< BG	114	< BG	15	98	10	< BG
Iopromid	87	1	93	2	83	< BG	90	< BG	25	89	8	< BG
Iothalamicsäure	47	27	15	44	52	25	34	58	147	< BG	21	< BG
Iopentol	68	2	84	4	76	< BG	99	< BG	16	102	2	< BG
Iodixanol	80	< BG	53	1	99	< BG	107	< BG	21	101	< BG	< BG

<BG = kleiner Bestimmungsgrenze

¹⁾ Elutionsmittel MeOH/Acetonitril + 4 Vol.-% NH₄OH-Lösung (25 %ige)

Eine Ausnahme hingegen stellt die Carbon-Phase dar. In diesem Fall konnten keine RKM im Durchbruch detektiert werden. Ursache der geringen Wiederfindung ist die schlechte Elution. Da nahezu eine 100 %ige Anreicherung an der Carbon-Kartusche erreicht wurde, sind weitere Versuche hinsichtlich Elutionsmittel durchgeführt worden. Es wurden verschiedene Elutionsmittel getestet. Neben reinem Methanol, wurde mit 0,5 Vol.-% Ameisensäure angesäuertem Methanol/Acetonitril-Gemisch (50/50; v/v), sowie Aceton und reinem Acetonitril eluiert. Keines der unterdrückten Elutionsmittel führte zum Erfolg und wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

Aufgrund der vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass alle 9 Festphasen keine großen Vorteile gegenüber der ENV+-Phasen boten, daher wurden für alle weiteren Tests nur noch Letztere verwendet.

pH-Wert der Probenlösung

Um eine zufrieden stellende Anreicherung der Analyten zu erlangen, ist der pH-Wert der Probenlösung in Abhängigkeit der pK_S- bzw. pK_B- Werte der Analyten einzustellen. Soll die Anreicherung z.B. an einem C18-Material erfolgen, müssen die RKM relativ ungeladen in der Probe vorliegen. Von anderen Autoren wird die Anreicherung der iodierten Diagnostika aus saurer Probenlösung (pH 3) durchgeführt [12, 31]. In dieser Arbeit wurde überprüft, bei welchem pH-Wert zwischen 2 und 4 die beste Anreicherung der Analyten auf der Festphase zu erwarten ist. Die Ergebnisse zur Ermittlung der Wiederfindungsraten sind in der Tabelle 26 zusammengestellt.

Tabelle 26: Untersuchungsergebnisse zum Einfluss des pH-Wertes auf die Wiederfindungsrate nach Festphasenextraktion.

RKM	pH 2 WDF (n=3) [%]	pH 3 WDF (n=3) [%]	pH 4 WDF (n=3) [%]
loversol	21	74	31
lopamidol	31	67	45
lobitridol	47	79	53
lohexol	37	77	48
lomeprol	42	62	59
Amidotrizoesäure	110	47	5
losarkol	40	95	67
lopromid	82	91	102
lothalamicsäure	108	55	5
lopentol	48	84	75
lodixanol	34	90	80

Aus der Tabelle ist eindeutig zu entnehmen, dass die besten Ergebnisse mit einem eingestellten pH-Wert von 3 erreicht werden. Eine Ausnahme stellen die ionischen RKM (Amidotrizoesäure und lothalamicsäure) dar. In diesem Fall zeigte der pH-Wert 2 die besseren Wiederfindungsraten. Ursache ist der stark ionische Charakter der RKM. Bei einem niedrigeren pH-Wert verschiebt sich das Gleichgewicht mehr auf die Seite der triiodierten Benzoessäurederivate und weniger auf die Seite der geladenen Carbonationen als bei pH 3 und 4. Während bei pH 2 Werte um 100 % WDF erreicht wurden, lagen die Wiederfindungen bei pH 3 nur noch zwischen 40 % und 50 % und bei pH 4 nur noch bei 5 %. Bei den nicht-ionischen RKM führt der niedrige pH-Wert vermutlich schon zur Protonierung der vorhandenen Amine, welche sich auf die Anreicherung negativ auswirkt. Aufgrund der hier erhaltenen Ergebnisse wurden für alle weiteren Versuche die Proben auf pH 3 eingestellt.

Variation der Extraktionsgeschwindigkeit

Die Extraktionsgeschwindigkeit sollte so gewählt werden, dass eine effektive Wechselwirkung zwischen Analyt und Sorbens möglich ist. Allerdings sollte dabei beachtet werden, dass auch größere Probenvolumina in einer angemessenen Zeit angereichert werden können. Eine zu schnelle Durchflussgeschwindigkeit hingegen, führt neben einer unvollständigen Retention auch zu einer Verdichtung des Materials bzw. zur Kanalbildung. Dies macht sich in der Zeitdauer bzw. in einer unzureichenden Anreicherung bemerkbar.

Tabelle 27: Ergebnisse zur Optimierung der Extraktionsgeschwindigkeit zur Anreicherung der Analyten aus der Wasserprobe.

RKM	6,5 ml/min* (n=4) WDF [%]	11 ml/min (n=4) WDF [%]	40 ml/min (n=4) WDF [%]
loversol	100	94	82
lopamidol	100	96	81
lobitridol	100	92	89
lohexol	100	89	86
lomeprol	100	92	81
Amidotrizoesäure	100	92	77
losarkol	100	86	69
lopromid	100	104	99
lothalamicsäure	100	103	77
lopentol	100	89	80
lodixanol	100	100	97

* = auf 100 % normiert!

Eine Optimierung der Durchflussgeschwindigkeit war in dieser Arbeit nur bedingt durchführbar. Aufgrund der Verwendung einer manuellen Vakuumextraktionseinheit konnten die Flussraten nur annähernd konstant vorgegeben werden. Es wurden drei verschiedene Geschwindigkeiten getestet. Neben einer Extraktionsgeschwindigkeit von 6,5 ml/min wurde auch 11 ml/min sowie 40 ml/min getestet.

Die Untersuchungen zeigten eindeutig eine Abhängigkeit der Extraktionsgeschwindigkeit auf die Anreicherungsrate (Tabelle 27). Während die Abhängigkeit zwischen der Flussrate 6,5 ml/min und 11 ml/min nur geringfügig ausfiel, zeigte die wesentlich höher eingestellte Geschwindigkeit von 40 ml/min schon Verluste bis zu 30 %. Den stärksten Einfluss verursachte die Variation der Extraktionsgeschwindigkeit auf die drei RKM Amidotrizoesäure, lothalamicsäure und losarkol. Ursache bei den ionischen RKM ist vermutlich die starke Polarität der Stoffe. losarkol hingegen besitzt gegenüber den restlichen RKM eine längere aliphatische Seitenkette. Ob dies allerdings der Grund für den stärkeren Einfluss ist, lässt sich im Rahmen dieser Untersuchungen nur vermuten. Vor dem Hintergrund, dass die ionischen RKM ohnehin schon geringere Wiederfindungsraten zeigen, wurde für alle weiteren Versuche die Extraktionsgeschwindigkeit auf etwa 6,5 ml/min festgelegt.

Aussalzversuche

Der Zusatz von anorganischen Salzen zur Probenlösung kann die Anreicherung der Analyten aufgrund der Veränderung der Löslichkeit begünstigen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von NaCl auf die Anreicherung der Analyten studiert. Dazu wurden jeweils zur Wasserprobe eine definierte Menge NaCl vor der Extraktion addiert. Getestet wurden die Konzentrationen von 0 g/l, 2,5 g/l und 5 g/l. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 wiedergegeben. Die Daten zu der hier dargestellten Graphik sind im Anhang unter Kapitel 9.1.8 tabellarisch zusammengefasst.

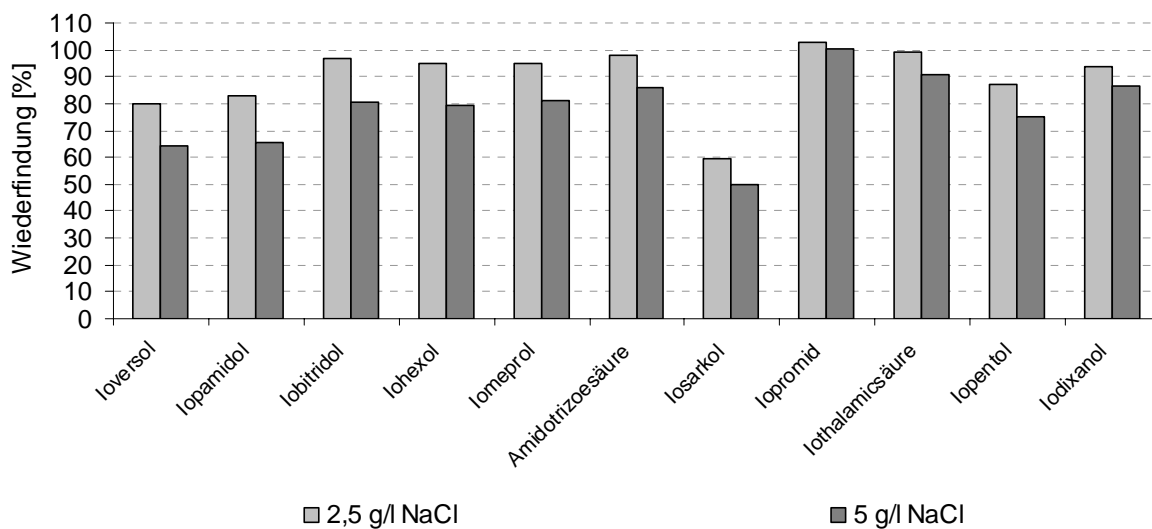


Abbildung 32: Graphische Darstellung der Ergebnisse zu dem in dieser Arbeit durchgeführten Aussalzversuche. Die Wiederfindungsraten sind bezogen auf die Ergebnisse der Konzentration 0 g/l NaCl.

Entgegen aller Erwartungen zeigte sich keine Verbesserung der Anreicherung. Die Beobachtungen deuten sogar eher auf eine negative Beeinträchtigung der Wiederfindungsraten hin. Etwaige Ursachen wurden hier nicht weiter verfolgt.

Einfluss einer Glasfaserfiltration auf die Wiederfindungsrate der Analyten

Oberflächenwasserproben benötigen vor der Festphasenextraktion eine Glasfaserfiltration zur Abtrennung eventueller Schwebstoffe. In Filtrationstests wurde das Adsorptionsverhalten an Glasfaserfiltern der ausgewählten Analyten studiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt. Die Daten sind im Anhang unter Kapitel 9.1.9 zusammengefasst. Keine der betrachteten Stoffe zeigte Adsorptionen > 5 %. Ursache ist die starke Polarität und gute Wasserlöslichkeit.

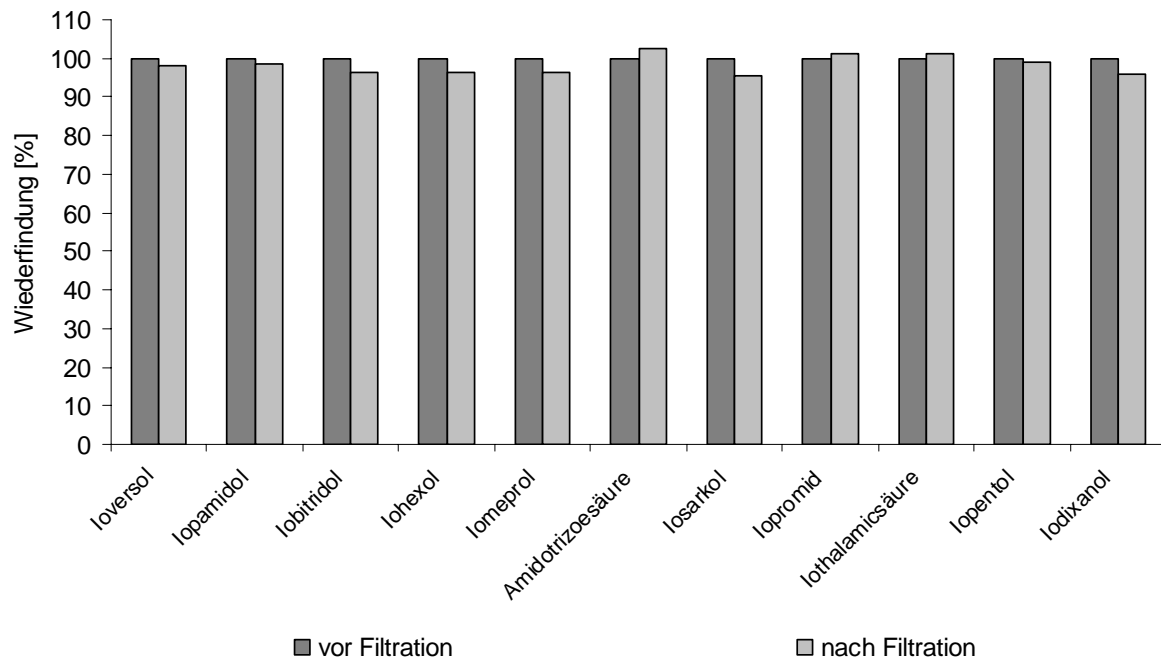


Abbildung 33: Graphische Darstellung der ermittelten Wiederfindungsraten vor und nach einer Glasfaserfiltration. Ergebnisse vor der Filtration wurden auf 100 % normiert.

Aus den in diesem Kapitel gewonnenen Erkenntnissen konnte das unter Kapitel 6.6.2.1 in Abbildung 11 dargestellte Probenvorbereitungsschema für matrixarme wässrige Proben erarbeitet werden.

7.4.2.2 Stark matrixbehaftete wässrige Proben

Das entwickelte Probenvorbereitungsverfahren für matrixarme Wasserproben (Kapitel 7.4.2.1) zeigte, beim Versuch es auf matrixreiche Wasserproben anzuwenden, einige Schwierigkeiten. Für die matrixreichen Proben wurde menschlicher Harn verwendet. Zum einen wurden aufgrund der gleichzeitig angereicherten Harn-Matrix nur sehr geringe Wiederfindungsraten < 2 % erreicht. Das aus der Festphasen-Anreicherung (10 ml Harn) erhaltene Extrakt zeigt eine starke orangefarbene bis hell bräunliche Färbung. Ursache der Färbung ist das im Urin enthaltene Urobilin. Zum anderen konnten, aufgrund starker Retentionszeit-verschiebungen an der HPLC-Säule, einige der Stoffe nicht mehr analysiert werden.

Die niedrigen Wiederfindungsraten weisen deutlich darauf hin, dass das Verfahren nicht ohne weiteres übernommen werden kann. In Kapitel 7.4.2.1 wurden Versuche durchgeführt, mittels Zugabe von NaCl in die aufzuarbeitende Wasserprobe, die

Wiederfindungsraten zu erhöhen. Dabei zeigte sich jedoch, dass eine Erhöhung der Salzkonzentration der Probenlösung zu einer Erniedrigung der Wiederfindungsraten führt. Im 24-Stunden Harn ist mit einer Konzentration von etwa 5,9 g Natrium und 8,9 g Chlorid zu rechnen. Diese hohen Gehalte sind mit den im Aussalzversuch angestrebten Konzentrationen (2,5 bis 5 g/l NaCl) noch nicht erreicht worden. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die hohen Salzfrachten Ursache der geringen Wiederfindungsraten sind, wurden Verdünnungsversuche durchgeführt. In Kapitel 6.6.2.2 ist die Vorgehensweise näher beschrieben. Der Harn (10 ml) wurde in 250 ml, 500 ml, 750 ml und 1000 ml Wasser vorgelegt und angereichert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 34 dargestellt. Die dazugehörigen Daten sind unter Kapitel 9.1.11 im Anhang tabellarisch zusammengefasst. Es ist zu beachten, dass aufgrund der immer noch sehr starken Verschiebung der Retentionszeiten der Analyten im Harnextrakt nur einige ausgewählte RKM in die Bewertung eingehen konnten.

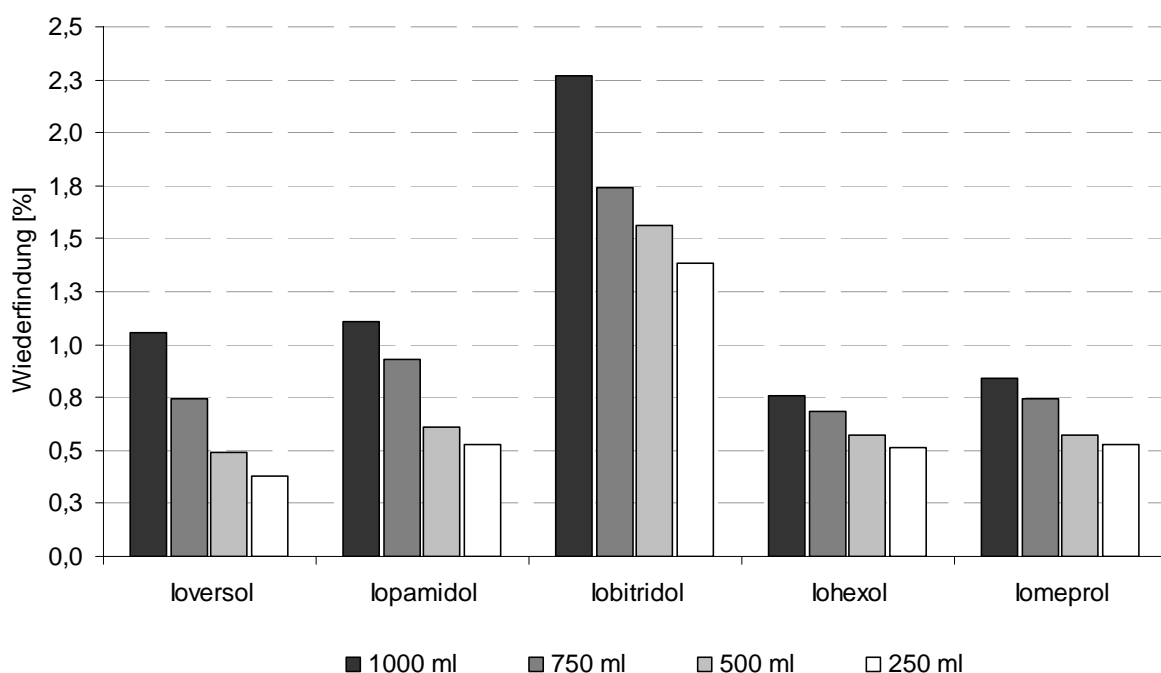


Abbildung 34: Darstellung der Ergebnisse zur Ermittlung des Einflusses einer Verdünnung der Harnprobe (10 ml Harn auf x ml Wasser) auf die Wiederfindungsraten einiger ausgewählter Analyten.

Durch die Verdünnung der Harnprobe konnte eine deutliche Verbesserung der Wiederfindungsraten erreicht werden. Bei einigen Analyten lag der Zuwachs der Wiederfindungsraten sogar um 100 %. Allerdings liegen die ermittelten Werte der ausgewählten RKM immer noch mit < 2,5 % viel zu niedrig, um eine empfindliche und verlässliche Analytik durchführen zu können. Zusätzlich kann festgehalten

werden, dass aufgrund dieser Ergebnisse die geringe Wiederfindung der RKM nicht ausschließlich durch die hohen Salzkonzentrationen verursacht wird. Es ist davon auszugehen, dass die restlichen Harn-Inhaltsstoffe (organischen Substanzen) den größten Teil der Signalverringering der Analyten im Extrakt der Probe verursachen. Welche der organischen Substanzen dafür verantwortlich sind, wurde durch Tests mit Einzelsubstanzen untersucht. Es wurden die Stoffe Citronensäure, Kreatinin und Harnstoff getestet. Dazu wurden 10 ml der Einzellösungen (Konzentration entspricht in etwa die des 24-Stunden-Harns) über Festphase angereichert. Es ist zu beachten, dass die RKM erst im Anschluss in das Extrakt dotiert wurden. Die Vorgehensweise wurde deshalb so gewählt, um den Einfluss der untersuchten Komponenten auf die Anreicherung der Analyten an der Festphase ausschließen zu können. Zum Vergleich wurde ebenfalls Harn in die Untersuchungen mit einbezogen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 35 dargestellt. Die zugehörigen Daten sind der Tabelle unter Kapitel 9.1.10 zu entnehmen.

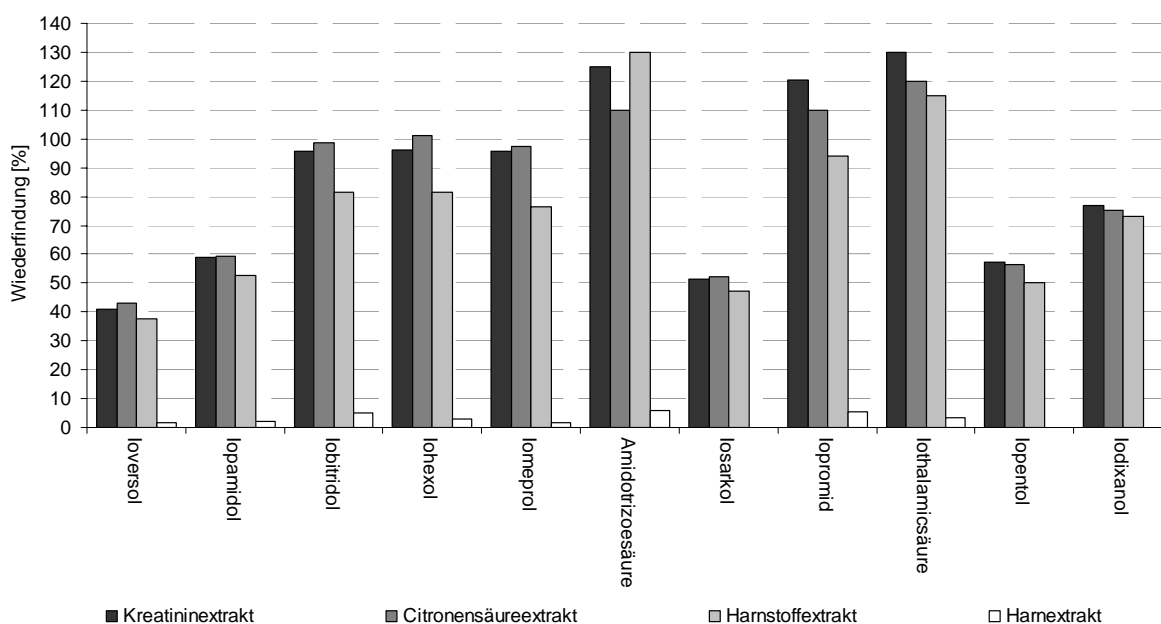


Abbildung 35: Einfluss der organischen Harn-Inhaltsstoffe auf die Wiederfindung der Analyten im Extrakt.

Die Untersuchungen konnten zeigen, dass die organischen Harn-Inhaltsstoffe nur in einigen Fällen zu einer starken Verringerung der Wiederfindung führten. Den stärksten Einfluss verursachten die organischen Substanzen auf den Arzneistoff Ioversol (WDF < 45%). Die ionischen RKM zeigten sogar einen Zuwachs in den Wiederfindungsraten. Diese Beobachtung wurde im Rahmen der Arbeit nicht weiter verfolgt. Festzuhalten ist allerdings, dass die parallel untersuchte Harnprobe einen wesentlich stärkeren Verlust in den Wiederfindungsraten aufzeigt. Die Schlussfolgerung dieser Beobachtung ist, dass nicht ausschließlich die drei studierten

Komponenten die Hauptverursacher der Signalverluste sind. Betrachtet man die in Tabelle 3 zusammengefassten Harninhaltsstoffe, so bleiben noch die Proteine, die Harnsäure, die Aminosäuren und der Farbstoff Urobilin, die ebenfalls Ursache der geringen Wiederfindungsraten sein könnten.

Mit Hilfe der in Kapitel 6.6.2.2 beschriebenen Proteinfällung wurden die Proteine aus der Probe entfernt. Die Abbildung 36 zeigt die Ergebnisse, wobei die Daten im Anhang unter Kapitel 9.1.12 tabellarisch zusammengefasst sind.

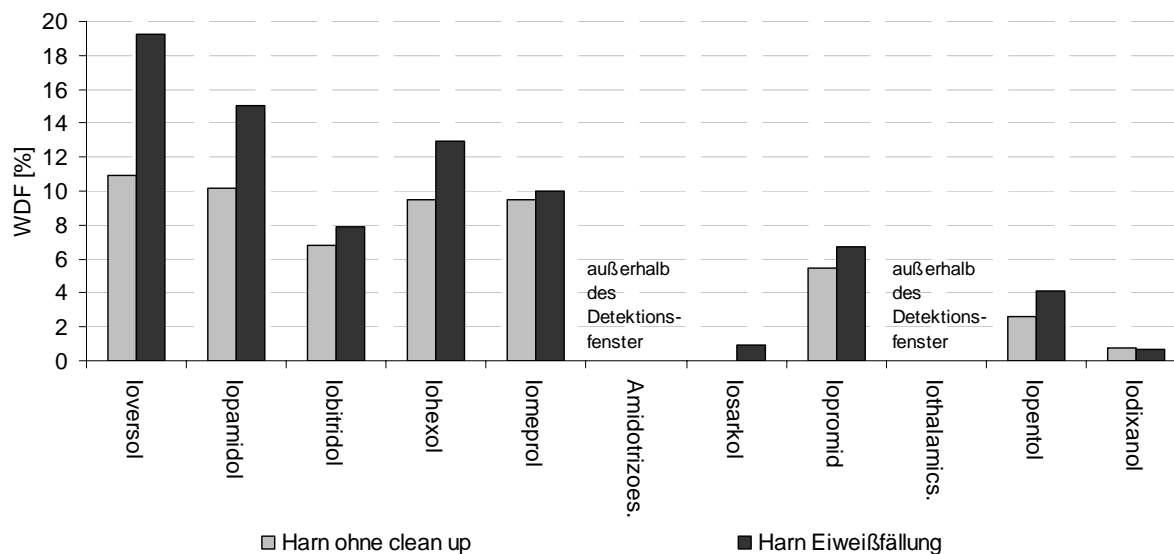


Abbildung 36: Einfluss einer vor der Anreicherung durchgeführten Eiweißfällung auf die Wiederfindung (WDF) der Analyten in menschlichem Harn.

Parallel zur Harnprobe mit Proteinfällung wurde eine Harnprobe ohne Proteinfällung aufgearbeitet und als Vergleich in der Graphik dargestellt. Nach der Anreicherung über Festphase zeigte sich eine Verbesserung der Signalintensitäten der Analyten im Falle der Proteinfällung. Die Wiederfindungsraten der RKM ergaben in Einzelfällen > 12 % WDF. Die ionischen RKM konnten auch in diesem Fall nicht bestimmt werden, da sie immer noch starke Retentionszeitverschiebungen zeigten. Neben der Proteinfällung wurden aber noch weitere clean-up Schritte, auf deren Tauglichkeit die Harnmatrix im Extrakt zu eliminieren, geprüft. Neben der Verwendung des Florisil Adsorbens wurden ein Anionen-Kationenaustauscher, sowie eine NH₂-Kartusche (Aminopropylmodifiziertes Kieselgel) getestet. Vor dem Hintergrund, dass Florisil laut Herstellerangaben für die Anreicherung von aliphatischen Carbonsäuren geeignet ist, wurde es zur Eliminierung der Aminosäuren getestet. Der Mixed-Ionentauscher (Anionen und Kationen) wurde, anlehnend an eine Literaturstelle, auf dessen Tauglichkeit überprüft [32]. Die NH₂-Kartusche ist aufgrund ihrer Polarität und schwacher Anionentauscher-Eigenschaften getestet worden. Laut Herstellerangaben ist diese

Festphase für die Anreicherung von Lipiden und für die Entfernung von Huminsäuren geeignet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 37 dargestellt. Zum Vergleich wurde menschlicher Harn ohne clean-up-Schritt aufgearbeitet. Die Daten sind dem Kapitel 9.1.12 zu entnehmen.

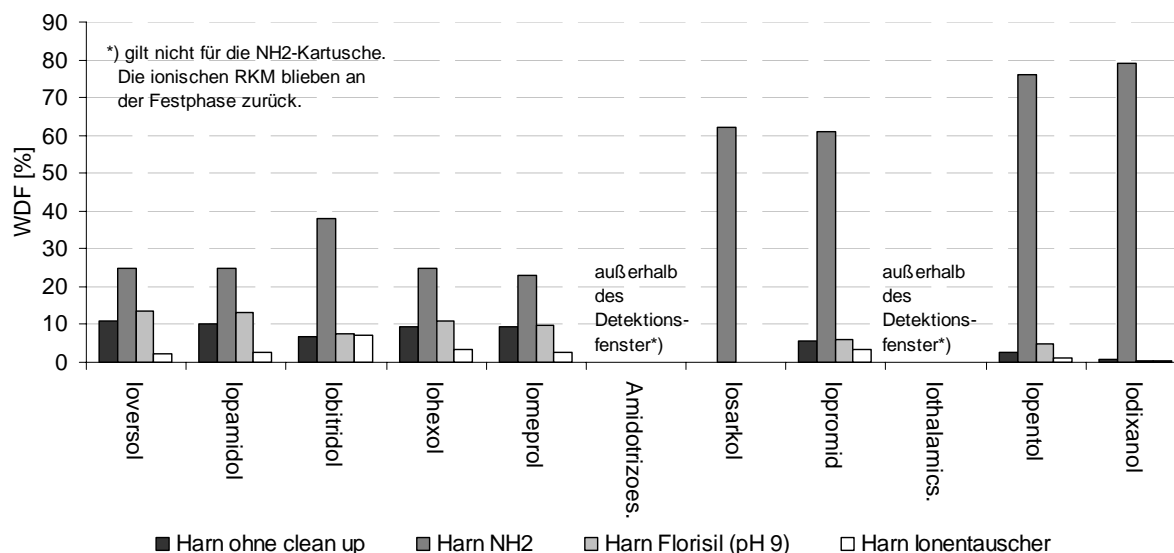


Abbildung 37: Einfluss eines vor der Anreicherung durchgeführten „clean-ups“ auf die Wiederfindung (WDF) der Analyten im menschlichen Harn.

Alle clean-up Schritte zeigten neben starken Retentionszeitverschiebungen immer noch niedrige Wiederfindungsraten. Eine Ausnahme bildet die NH₂-Kartusche. Die NH₂-Festphase liefert in der Regel Wiederfindungsraten > 25 %. Bei vier der untersuchten RKM liegen die Wiederfindungsraten sogar oberhalb 60 %. Der einzige Nachteil ist, dass das Adsorbens ebenfalls die ionischen RKM anreichert. Sie bleiben neben der störenden Matrix Harn ebenfalls am Adsorbens haften. Festzuhalten ist, dass die NH₂-Kartusche neben guten Wiederfindungsraten auch die Retentionszeitverschiebung minimiert.

Anhand von drei Beispielen ist die aus der Matrix Harn resultierende starke Retentionszeitverschiebung in Abbildung 38 dargestellt. Ioversol, ein Analyt mit niedriger Retentionszeit auf der HPLC-Säule Gemini, zeigte lediglich eine Verschiebung von ca. 0,2 Minuten zu kürzeren Retentionszeiten hin. Die ionische Amidotrizoesäure hingegen eluiert unter 8 Minuten. Das führt dazu, dass der Stoff außerhalb dem in Kapitel 6.3 beschriebenen Segment-Fenster eluiert und somit nicht mehr detektiert werden kann. Auch das Iopromid zeigte eine Verschiebung von 2 Minuten zu kürzeren Retentionszeiten hin. Wird der Extrakt der Festphasenanreicherung im Anschluss über eine NH₂-Festphase gereinigt, so eluieren die betrachteten Analyten aus dem Extrakt nahezu zu den gleichen Zeiten wie bei der matrixfreien Wasseranalytik.

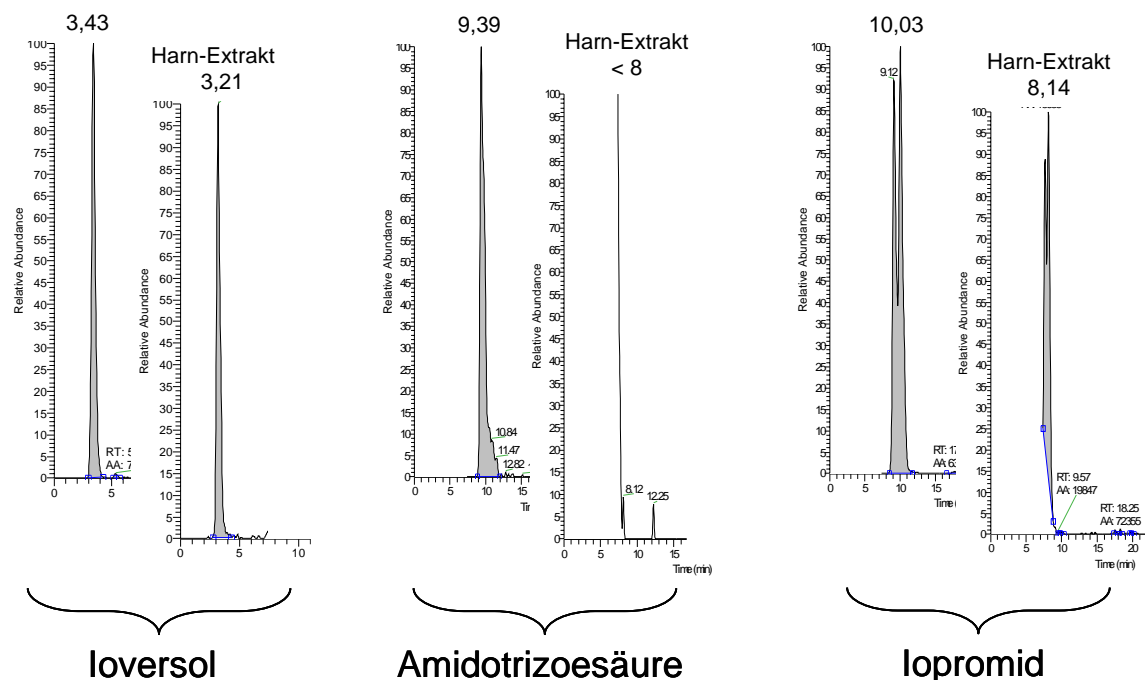


Abbildung 38: Darstellung der Retentionszeitverschiebung einiger ausgewählter Analyten bei Injektion eines Harn-Extrakts. Vergleich der Retentionszeiten in ohne und mit Harn-Extrakt.

Ursache für das gute Ergebnis der NH_2 -Kartusche (relativ hohe WDF, nahezu keine Retentionszeitverschiebung) liegt vermutlich in den an der Festphase befindlichen Aminogruppen und deren polarem Charakter. Die Aminogruppen besitzen schwache Anionentauscher-Eigenschaften und sind vermutlich für die Elimination der Aminosäuren verantwortlich. Eine weitere wichtige Gruppe, die an der Festphase adsorbieren könnte, sind die Proteine des Harns, die zum Teil ionischen Charakter besitzen. Ebenfalls sollte festgehalten werden, dass nach dem clean-up über die NH_2 -Kartusche der Extrakt nicht mehr orange braun ist, sondern nur noch eine schwache Gelbfärbung aufweist. Die Gelbfärbung des Harns wird durch den Stoff Urobilin verursacht. Urobilin ist ein Abbauprodukt des Gallenfarbstoffs. Das Abbauprodukt Urobilin besitzt neben vielen Aminogruppen ebenfalls zwei Carbonsäuregruppen, die für die Anreicherung verantwortlich sein können.

Zusammenfassend betrachtet liefert die NH_2 -Kartusche als Reinigungsschritt die besten Ergebnisse. Neben guten Wiederfindungsraten konnten die starken Retentionszeitverschiebungen minimiert werden. Ein Nachteil liegt in der gleichzeitigen Anreicherung der ionischen RKM. Um auch die ionischen Vertreter analysieren zu können wurde untersucht, ob man vor dem Reinigungsschritt mit der NH_2 -Kartusche einen Teil der Lösung abnehmen und direkt vermessen kann. Neben starken Retentionszeitverschiebungen zeigten die ionischen RKM niedrige Wiederfindungsraten,

sodass diese Variante ungeeignet zu sein scheint. Eine weitere Möglichkeit wäre, die Analyten von der getrockneten NH_2 -Kartusche mit geeignetem Lösungsmittel zu eluieren. Diesbezüglich wurden ebenfalls Tests in dieser Arbeit durchgeführt. Die Vorgehensweise ist unter Kapitel 6.6.2.2 näher beschrieben.

Hexan zeigt keinerlei Elutionskraft. Auch das Methanol/Acetonitril-Gemisch (50/50; v/v) reichte nicht aus, die ionischen RKM von dem Adsorbens zu eluieren. Lediglich die verwendeten ammoniakalischen Elutionsmittel (Methanol/Acetonitril-Gemisch (50/50; v/v) und Wasser) führten zur Elution der ionischen RKM. Vor dem Hintergrund, dass es sich bei den NH_2 -Kartuschen um einen schwachen Anionentauscher handelt, ist dies nicht weiter verwunderlich. Die von der ammoniakalischen Lösung bereitgestellten OH^- -Ionen lösen die ionisch gebundenen RKM von der Festphase ab, in dem sie selbst an diese Bindungsstelle treten.

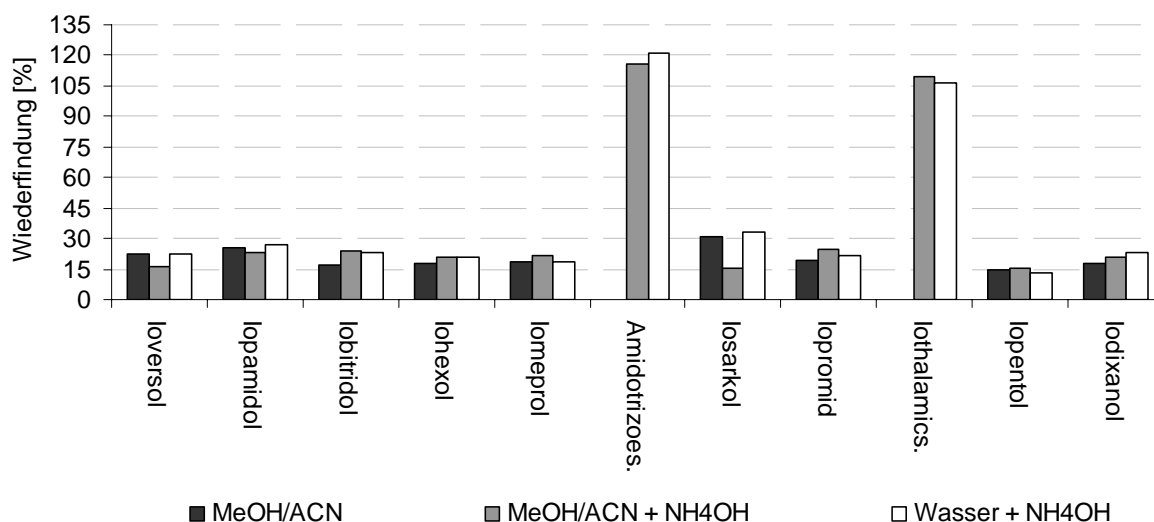
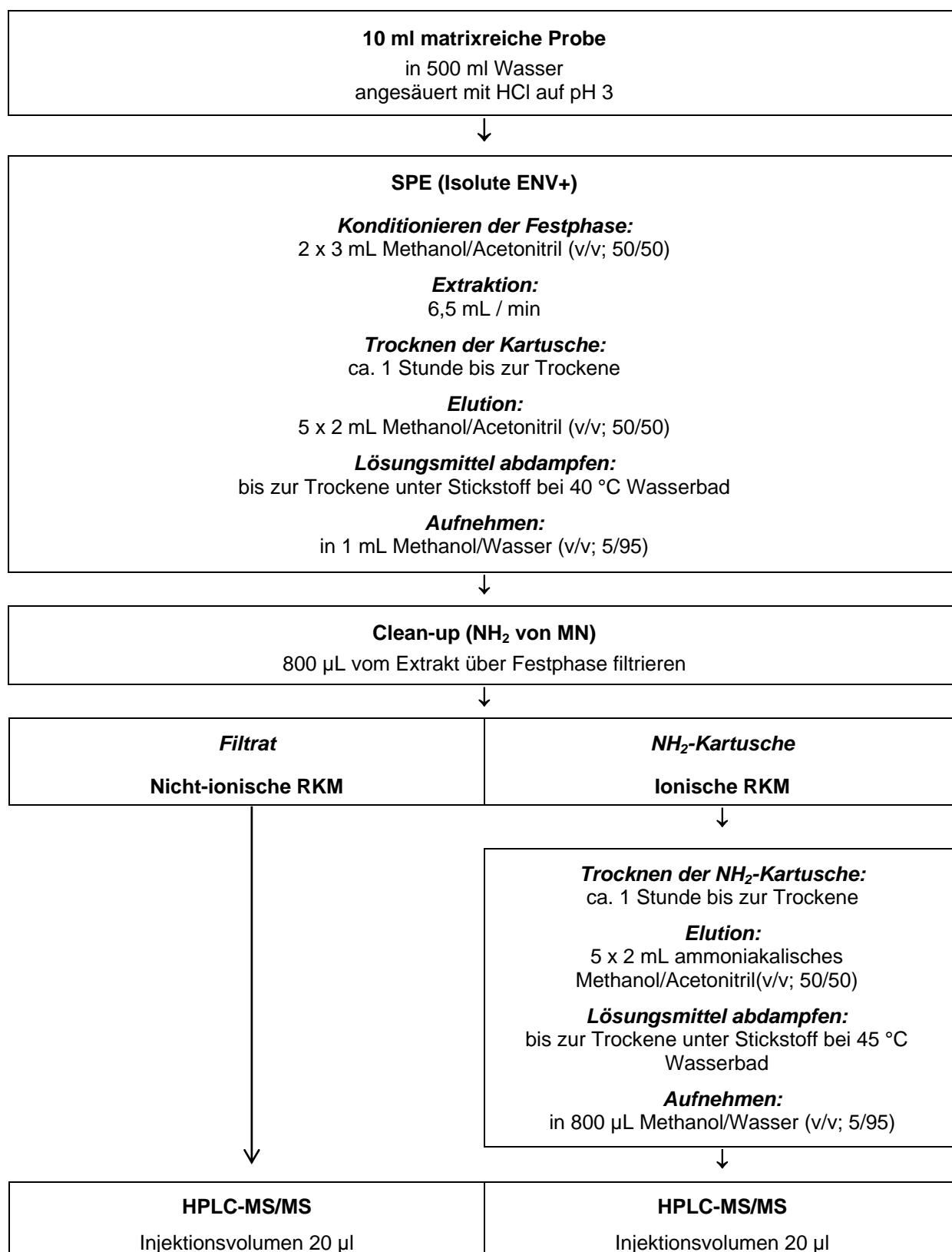


Abbildung 39: Ergebnisse zur Überprüfung der Elutionskraft einiger ausgewählter Elutionsmittel die ionischen Analyten von der Reinigungskartusche zu entfernen.

Aber nicht nur die ionischen RKM werden von der Festphase eluiert, sondern auch die restlichen RKM. Dies deutet darauf hin, dass beim Durchführen des Reinigungsschrittes auch die nicht-ionischen RKM zu einem geringen Teil an der NH_2 -Kartusche festgehalten werden. Um eine quantitative Aussage treffen zu können, wie viel der nicht-ionischen Diagnostika an der Festphase adsorbieren, wurde diesbezüglich ein Test durchgeführt. Dazu wurde eine Probenlösung aus HPLC-Wasser hergestellt und mit den untersuchten RKM dotiert. Ein Teil der Probenlösung wurde direkt vermessen und als 100 % Wiederfindung normiert, während der andere Teil über eine NH_2 -Kartusche filtriert wurde. Dabei zeigt sich, dass im Mittel etwa 5 % der nicht-

ionischen RKM beim Reinigungsschritt an der Festphase angereichert werden. Die Daten sind unter Kapitel 9.1.13 zusammengefasst.

Aus den in diesem Kapitel gewonnenen Erkenntnissen konnte nun folgendes Probenvorbereitungsschema für matrixreiche wässrige Proben erarbeitet werden:



Zu beachten ist, dass nach dem Reinigungsschritt das Filtrat sowie die NH₂-Kartusche weiter verwendet werden. Nachteilig ist, dass mit diesem Verfahren je Probe zwei Messungen durchgeführt werden müssen. Aber ohne die Abwandlung des Verfahrens, ist es unmöglich die iodierten RKM in matrixreichen Proben empfindlich analysieren zu können.

7.5 Validierung der Analysenverfahren

Zur Bewertung der beiden in dieser Arbeit entwickelten Verfahren wurden Verfahrenskennndaten aufgenommen.

7.5.1 Matrixarme wässrige Proben

Trinkwasser

ohne Probenvorbereitung

Die Tabelle 28 zeigt die Ergebnisse der Verfahrenskennndaten zur Trinkwasseranalytik mittels direkter Messung ohne vorgeschalteter Probenvorbereitung. Die Verfahrenskennndaten wurden nach DIN 38 402 erhoben.

Tabelle 28: Zusammenfassung der Verfahrenskennndaten zur Analytik der ausgewählten Röntgenkontrastmittel in Trinkwasser (Direktmessung) nach DIN 38 402.

RKM	Bestimmungsgrenze (3-fache der NWG) [µg/l]	Linearität (c = 25 bis 275 µg/l) r	Wiederholstandardabweichung (c = 175 µg/l; n = 5) [SA _{Wh.} in %]	Verfahrensstandardabweichung (c = 25 bis 275 µg/l; n = 5) [SA _{Verf.} in %]
loversol	23,5	0,9987	1,1	2,94
lopamidol	20,9	0,9990	1,5	2,62
lobitridol	16,1	0,9994	2,5	2,02
lohexol	20,5	0,9990	1,5	2,57
lomeprol	21,7	0,9989	2,7	2,71
Amidotrizoesäure	103,8	0,9761	11,4	12,99
losarkol	73,4	0,9878	5,2	9,18
lopromid	24,5	0,9986	2,3	3,06
lothalamicsäure	30,3	0,9979	6,7	3,79
lopentol	19,7	0,9991	2,2	2,47
lodixanol	27,1	0,9983	2,0	3,39

NWG=Nachweisgrenze

mit Probenvorbereitung

Die Ergebnisse der Validierung zur Analytik der Röntgenkontrastmittel in Trinkwasser mittels Probenvorbereitung (Probenvorbereitungsschema: Abbildung 11) sind in der Tabelle 29 zusammengefasst. Neben der Bestimmungsgrenze sind die Linearität, die Verfahrensstandardabweichung und die Wiederfindung (WDF) nach der Festphasenextraktion aufgelistet.

Tabelle 29: Zusammenfassung der Verfahrenskenndaten zur Analytik der ausgewählten Röntgenkontrastmittel in Trinkwasser mittels Festphasenextraktion.

RKM	Bestimmungs- grenze (S/N = 12) [µg/l]	Linearität (c = 0,1 bis 0,5 µg/l) r	Verfahrensstandard- abweichung (c = 0,1 bis 0,5 µg/l; n = 3) [SA _{Verf.} in %]	WDF nach SPE (c = 0,3 µg/l; n = 3) [%]
Ioversol	0,04	0,9986	3,2	69
Iopamidol	0,05	0,9987	3,1	64
Iobitridol	0,02	0,9989	2,8	72
Iohexol	0,05	0,9987	3,1	65
Iomeprol	0,02	0,9973	4,5	42
Amidotrizoesäure	0,05	0,9858	10,4	42
Iosarkol	0,03	0,9971	4,6	110
Iopromid	0,05	0,9991	2,6	87
Iothalamicsäure	0,05	0,9996	1,6	47
Iopentol	0,04	0,9967	4,9	46
Iodixanol	0,06	0,9963	5,2	31

Neben einer sehr guten Verfahrensstandardabweichung konnte, mit und ohne Probenvorbereitung, für fast jeden Stoff eine gute Linearität ermittelt werden. Die Werte des Korrelationskoeffizienten (r) lagen mit Ausnahme der Amidotrizoesäure und Iosarkol oberhalb 0,996. Für die Amidotrizoesäure ergab sich ein Korrelationskoeffizient ohne Probenvorbereitung von 0,9761 und mit Probenvorbereitung von 0,9858. Dieser Sachverhalt spiegelt sich auch in den Standardabweichungen des Stoffes wieder. Mit 11,4 % Wiederhol-standardabweichung und 12,99 % Standardabweichung über den kompletten Arbeitsbereich bei der Direktmessung, ergab sich für das ionische RKM eine schlechtere Reproduzierbarkeit als für alle übrigen untersuchten Diagnostika. Die Analytik in Trinkwasser mit vorheriger Festphasenextraktion lieferte einen geringfügig besseren Wert. Das RKM Iosarkol zeigte für die Analytik mit einer Probenvorbereitung, ebenfalls wie die Amidotrizoesäure, einen

etwas besseren Wert. Der Grund für diesen Trend konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Die Bestimmungsgrenzen für das Verfahren ohne Probenvorbereitung, ermittelt über DIN 38 402, ergaben Werte zwischen 16 und 104 µg/l. Die Bestimmungsgrenzen für das Verfahren mit einer Probenvorbereitung (S/N=12) liegen mit 0,02 µg/l und 0,06 µg/l, aufgrund der Anreicherung, um einiges niedriger.

Oberflächenwasser

mit Probenvorbereitung

Die Ergebnisse der Validierung zur Analytik der Röntgenkontrastmittel in Oberflächenwasser mittels Probenvorbereitung (Probenvorbereitungsschema: Abbildung 11) sind in der Tabelle 30 zusammengefasst. Neben der Bestimmungsgrenze sind die Linearität, die Verfahrensstandardabweichung und die Wiederfindung (WDF) nach Festphasenextraktion aufgelistet.

Tabelle 30: Zusammenfassung der Verfahrenskennndaten zur Analytik der ausgewählten Röntgenkontrastmittel in Oberflächenwasser mittels Festphasenextraktion.

RKM	Bestimmungs- grenze (S/N = 12) [µg/l]	Linearität (c = 0,1 bis 0,5 µg/l) r	Verfahrensstandard- abweichung (c = 0,1 bis 0,5 µg/l; n = 3) [SA _{verf.} in %]	WDF nach SPE (c = 0,3 µg/l; n = 3) [%]
loversol	0,06	0,9977	4,1	64
lopamidol	0,05	0,9980	4,9	65
lobitridol	0,05	0,9987	3,1	69
lohexol	0,06	0,9980	8,3	62
lomeprol	0,05	0,9989	6,9	43
Amidotrizoesäure	0,10	0,9869	14,7	37
losarkol	0,07	0,9944	6,5	93
lopromid	0,05	0,9917	7,9	72
lothalamidsäure	0,10	0,9970	4,7	31
lopentol	0,10	0,9922	7,7	56
lodixanol	0,20	0,9874	9,7	45

Neben einer guten Verfahrensstandardabweichung konnte für fast jeden Stoff eine gute Linearität ermittelt werden. Eine Ausnahme bildet die Amidotrizoesäure mit einer Verfahrensstandardabweichung von 14,7 %. Die Werte des Korrelationskoeffizienten (r) lagen in der Regel oberhalb 0,992. Wie auch schon beim Trinkwasser

zeigte die Amidotrizoesäure eine etwas weniger gute Linearität. Der Korrelationskoeffizient (r) lag bei einem Wert von 0,9869. Iodixanol lieferte ebenfalls für die lineare Regression einen Wert unterhalb 0,99. Die Bestimmungsgrenzen der einzelnen Stoffe liegen mit Werten zwischen 0,05 µg/l und 0,20 µg/l höher als bei Trinkwasser.

Auffallend ist, dass die Amidotrizoesäure in allen Untersuchungen in der Regel die höchste Verfahrensstandardabweichung aufweist. Ein Grund für dieses Phänomen ist die geringe Empfindlichkeit des Analyten. Zum Vergleich wurden die Kalibrierungskurven einiger RKM in der Abbildung 40 dargestellt. Man erkennt deutlich, dass die Gerade der Amidotrizoesäure eine kleinere Steigung und somit geringere Empfindlichkeit als die übrigen RKM besitzt.

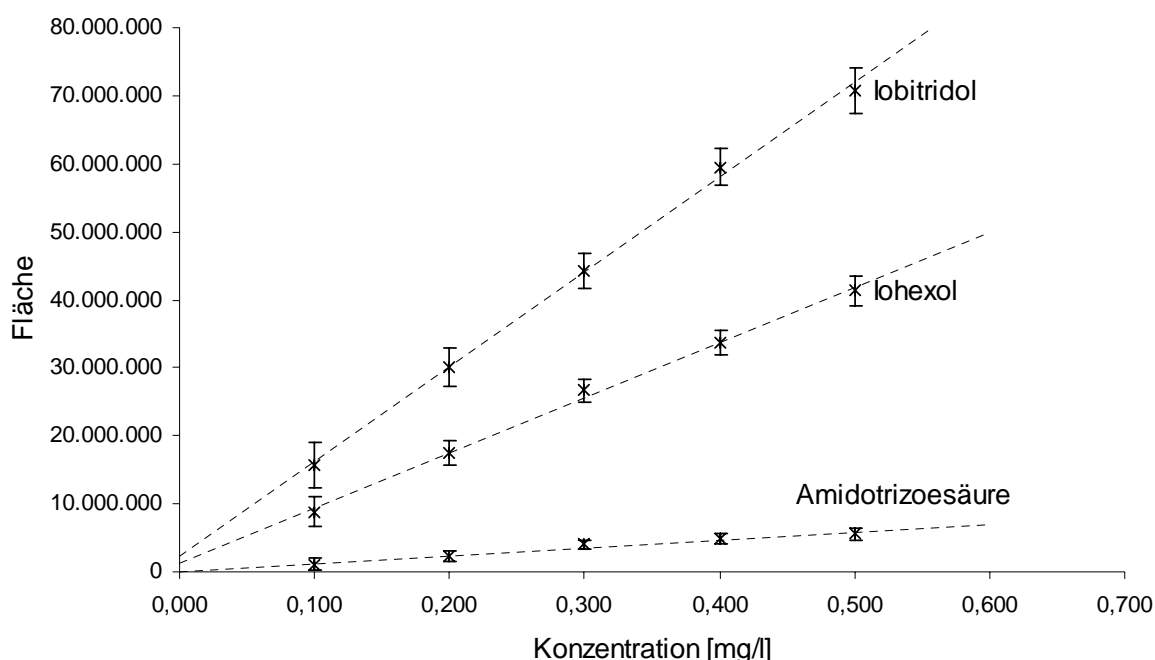


Abbildung 40: Darstellung der Kalibrierungskurve einiger ausgewählter RKM

Alle erhaltenen Ergebnisse in diesem Kapitel zeigen, dass das entwickelte Verfahren einschließlich Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion zur Bestimmung von elf iodierten RKM in Trinkwasser und Oberflächenwasser erfolgreich eingesetzt werden kann.

7.5.2 Stark matrixbehaftete wässrige Proben (menschlicher Harn)

ohne Probenvorbereitung (1/100 verdünnt)

Die folgende Tabelle 31 zeigt die Ergebnisse der Validierung. Neben der Linearität sind die Verfahrensstandardabweichung, die Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze aufgelistet. Trotz schwieriger Matrix Harn zeigten die RKM eine gute Linearität in dem betrachteten Arbeitsbereich. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten r lagen bei Werten $> 0,992$. Die Verfahrenstandardabweichung lag unterhalb 9 %. Die Nachweisgrenzen nahmen Werte von 0,11 mg/l bis 1,67 mg/l an. Die Bestimmungsgrenzen lagen zwischen 0,34 mg/l und 5,0 mg/l.

Tabelle 31: Zusammenfassung der ermittelten Verfahrenskenndaten zur Analytik der ausgewählten RKM in Harn ohne Probenaufarbeitung (1/100 verd.).

Arzneistoff	Linearität ($c = 0,1$ bis $0,5 \mu\text{g/l}$) r	Verfahrensstandard- abweichung ($c = 0,1$ bis $0,5 \mu\text{g/l}$; $n = 4$) [SA _{Verf.} in %]	Nachweisgrenze nach DIN 38 402 [mg/l]	Bestimmungsgrenze (3'fache NWG) [mg/l]
loversol	0,9989	3,3	0,62	1,87
lopamidol	0,9994	2,4	0,45	1,36
lobitridol	0,9979	2,5	0,11	0,34
lohexol	0,9968	5,7	1,07	3,21
lomeprol	0,9981	4,4	0,82	2,46
Diatrizoat	0,9932	8,3	1,56	4,68
losarkol	0,9962	6,1	1,15	3,46
lopromid	0,9979	4,0	0,76	2,28
lothalamicsäure	0,9973	5,2	0,98	2,95
lopentol	0,9976	4,9	0,92	2,77
lodixanol	0,9922	8,9	1,67	5,00

mit Probenvorbereitung

Die folgende Tabelle 32 zeigt die Ergebnisse der Validierung des Verfahrens zur Bestimmung der RKM in stark matrixbehafteten Proben (Probenvorbereitungsschema unter Kapitel 7.4.2.2). Neben der Linearität sind die Verfahrensstandardabweichung, Bestimmungsgrenze und Wiederfindung aufgelistet.

Tabelle 32: Zusammenfassung der ermittelten Verfahrenskenndaten zur Analytik der ausgewählten RKM in Harn mit Probenaufarbeitung.

RKM	Bestimmungsgrenze (3-fache der NWG) [µg/l]	Linearität (c = 0,1 bis 0,5 µg/l) r	Verfahrensstandard- abweichung (c = 0,1 bis 0,5 µg/l; n = 3) [SA _{Verf.} in %]	WDF nach SPE (c = 0,3 µg/l; n = 3) [%]
Ioversol	0,15	0,9874	9,7	33
Iopamidol	0,20	0,9758	13,6	36
Iobitridol	0,13	0,9894	8,9	71
Iohexol	0,08	0,9964	5,2	63
Iomeprol	0,18	0,9810	12,0	58
Amidotrizoesäure	0,26	0,9896	8,8	44
Iosarkol	0,15	0,9870	9,9	84
Iopromid	0,09	0,9946	6,3	116
Iothalamicsäure	0,28	0,9888	9,2	27
Iopentol	0,06	0,9977	4,1	104
Iodixanol	0,10	0,9938	6,8	135

Die ermittelten Bestimmungsgrenzen liegen mit Werten zwischen 0,06 bis 0,28 µg/l deutlich niedriger als bei der Analytik ohne Probenvorbereitung. Die Linearität liegt mit Ausnahme von Iopamidol oberhalb 0,981. Bei Iopamidol ergibt sich für die lineare Regression ein Wert von 0,9758. Dieser Stoff zeigt auch die höchste Verfahrensstandardabweichung. Trotz schwieriger Matrix und sehr umfangreicher Probenaufarbeitungsschritte liegen die ermittelten Verfahrensstandardabweichungen der elf Diagnostika unterhalb 13,6 %.

7.5.3 Quantifizierung in unterschiedlichen Matrices über eine externe Kalibrationsreihe

Die oben beschriebenen Verfahrenskenndaten zeigen, dass die beiden entwickelten Analysenmethoden eine hinreichend empfindliche Bestimmung der ausgewählten Arzneistoffe zulassen. Die Methoden zeichnen sich durch eine hohe Verfahrensreproduzierbarkeit und eine gute lineare Abhängigkeit des Messsignals zur Analytkonzentration aus.

Um eine Aussage treffen zu können, ob eine externe Kalibrationsreihe für die Ermittlung der Konzentrationen der Proben geeignet ist, wurden die Analyten in Trinkwasser, Oberflächenwasser und Harn zudosiert, bestimmt (IST-Wert) und mit dem entsprechenden theoretischen Sollwert verglichen. Die Ergebnisse der Tests sind in der nachfolgenden Tabelle 33 zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 33: Ergebnisse zur Bestimmung des SOLL/IST-Wertes für die Bestimmung der ausgesuchten RKM in Trinkwasser, Oberflächenwasser und Harn.

RKM	<i>Trinkwasser</i> (n=1)		<i>Oberflächenwasser</i> (n=1)		<i>Harn</i> (n=1)	
	SOLL-Wert [µg/l]	IST-Wert [µg/l]	SOLL-Wert [µg/l]	IST-Wert [µg/l]	SOLL-Wert [µg/l]	IST-Wert [µg/l]
loversol	0,338	0,33	0,250	0,24	0,450	0,09
lopamidol	0,338	0,32	0,250	0,23	0,450	0,11
lobitridol	0,338	0,38	0,250	0,24	0,450	0,19
lohexol	0,338	0,41	0,250	0,26	0,450	0,12
lomeprol	0,338	0,38	0,250	0,25	0,450	0,09
Amidotrizoesäure	0,338	0,33	0,250	0,23	0,450	0,23
losarkol	0,338	0,31	0,250	0,23	0,450	0,28
lopromid	0,338	0,36	0,250	0,25	0,450	0,29
lothalamicsäure	0,338	0,37	0,250	0,24	0,450	0,21
lopentol	0,338	0,30	0,250	0,23	0,450	0,34
lodixanol	0,338	0,29	0,250	0,22	0,450	0,36

Die in der Tabelle 33 gezeigten Ergebnisse zeigen eindeutig die Praxistauglichkeit des Verfahrens für matrixarme Wasserproben. Die Verwendung einer externen Kalibrationsreihe zur Quantifizierung ist im Fall einer Trinkwasser und Oberflächenwasseranalytik ohne Bedenken einsetzbar. Das Verfahren zur Untersuchung von matrixreichen Wasserproben sollte hingegen mittels Standardadditionsverfahren durchgeführt werden. Die Ist-Ergebnisse liegen durchweg stark unterhalb des Soll-Werts. Trotz aufwendiger Reinigungsschritte scheint die Matrix nicht ausreichend entfernt zu sein. Somit kommt es immer noch zu einer, wenn auch wesentlich geringeren, Signaldepression der Analyten. Eine Quantifizierung über Standardaddition ist demnach zwingend erforderlich.

7.6 Stabilitätstest der RKM in matrixarmen und stark matrixbehafteten wässrigen Proben

Die Stabilität von sechs ausgewählten Röntgenkontrastmitteln wurde durch eine fünfmonatige Lagerung bei Raumtemperatur (25 °C), mit und ohne Lichtausschluss, in den beiden Matrices Wasser und Harn überprüft. Während des Untersuchungszeitraums konnte in keinem der Ansätze ein wesentlicher Abbau festgestellt werden. Die gemessenen Konzentrationen lagen in der Regel in der Höhe der zudotierten Konzentrationen.

7.7 Untersuchungsprogramm ausgewählter Röntgenkontrastmittel in Oberflächengewässer

Die Ergebnisse, die während des Monitoring-Programms erhalten wurden, sind in der Abbildung 41 bis Abbildung 43 dargestellt. Die dazugehörigen Daten sind dem Anhang Kapitel 9.1.14 bis Kapitel 9.1.16 zu entnehmen.

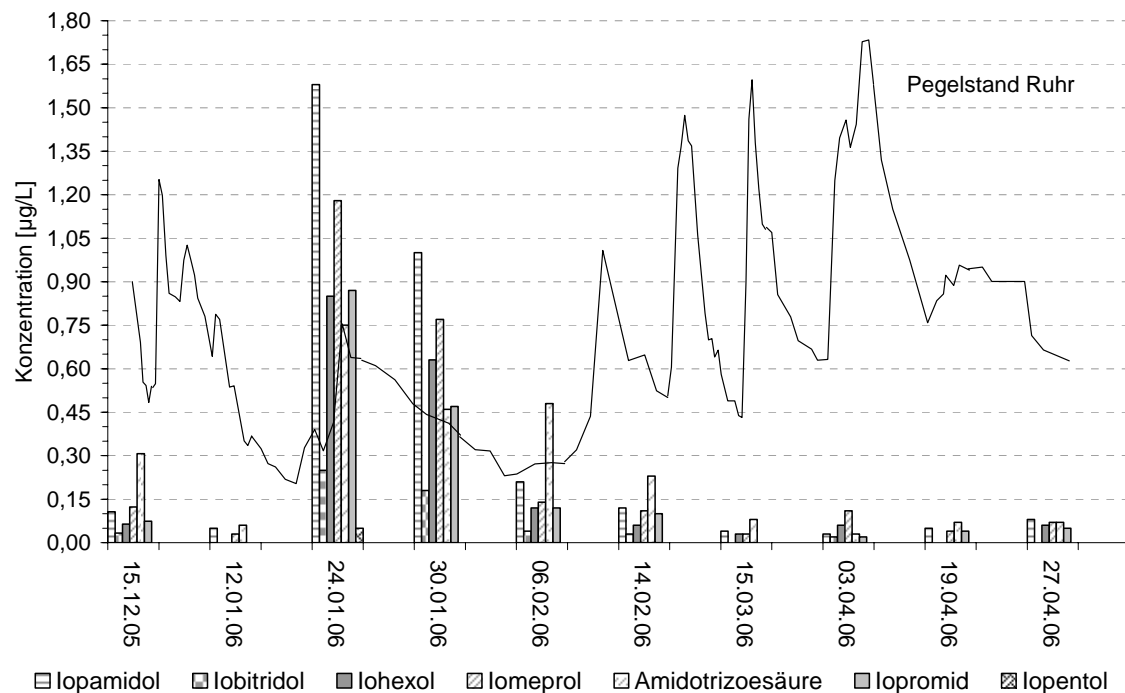


Abbildung 41: Ergebnisse der Untersuchung von Röntgenkontrastmittel in der Ruhr (Mülheim). Zum Vergleich ist der Pegelstand der Ruhr ebenfalls eingezeichnet [33].

In der Ruhr zeigten sieben der untersuchten iodierten Diagnostika positive Befunde. Die drei Stoffe lopamidol, lomeprol und Amidotrizoesäure wurden in jeder der insgesamt 8 untersuchten Wasserproben nachgewiesen. Es wurden Maximalwerte von $1,6 \mu\text{g/l}$ für lopamidol und $1,2 \mu\text{g/l}$ für lomeprol ermittelt. Auch die drei Kontrastmittel lohexol, lopromid und Amidotrizoesäure lagen mit Maximalwerten um $0,8 \mu\text{g/l}$ in ähnlicher Größenordnung. lobitridol und lopentol konnten ebenfalls bestimmt werden, wobei die ermittelten Konzentrationen jedoch etwas niedriger lagen. Die Arzneimittel losarkol, loversol, das Dimer Iodixanol sowie die Iothalamicsäure konnten in keiner der untersuchten Ruhrproben nachgewiesen werden.

Das Monitoring am Rhein lieferte ähnliche Ergebnisse. In den Wasserproben der beiden Messstellen zeigten acht der untersuchten Diagnostika positive Befunde. Für die Stoffe lopamidol, lohexol, lomeprol, Amidotrizoesäure und lopromid lagen die ermittelten Maximalkonzentrationen bei Düsseldorf zwischen $0,4$ und $0,7 \mu\text{g/l}$.

Stromabwärts bei Rees lagen die gemessenen Maximalwerte mit 0,4 bis 0,9 µg/l etwas höher. Die genannten fünf RKM waren in allen 18 untersuchten Wasserproben vertreten. Die Diagnostika Iopentol, Ioversol sowie Iobitridol wurden ebenfalls nachgewiesen. Allerdings lagen die ermittelten Konzentrationen mit Werten zwischen 0,07 und 0,24 µg/l deutlich niedriger. Die Arzneimittel Iosarkol, das Dimer Iodixanol sowie die Iothalamidsäure konnten im Rhein in keiner der untersuchten Wasserproben nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Ergebnisse am Rhein mit denen an der Ruhr zeigt, dass die gemittelten Konzentrationen der Messstelle Düsseldorf und Rees niedriger liegen als die gemittelten Ergebnisse der Probenahmestelle an der Ruhr. Dies ist auf einen höheren Abwasseranteil der Ruhr zurückzuführen.

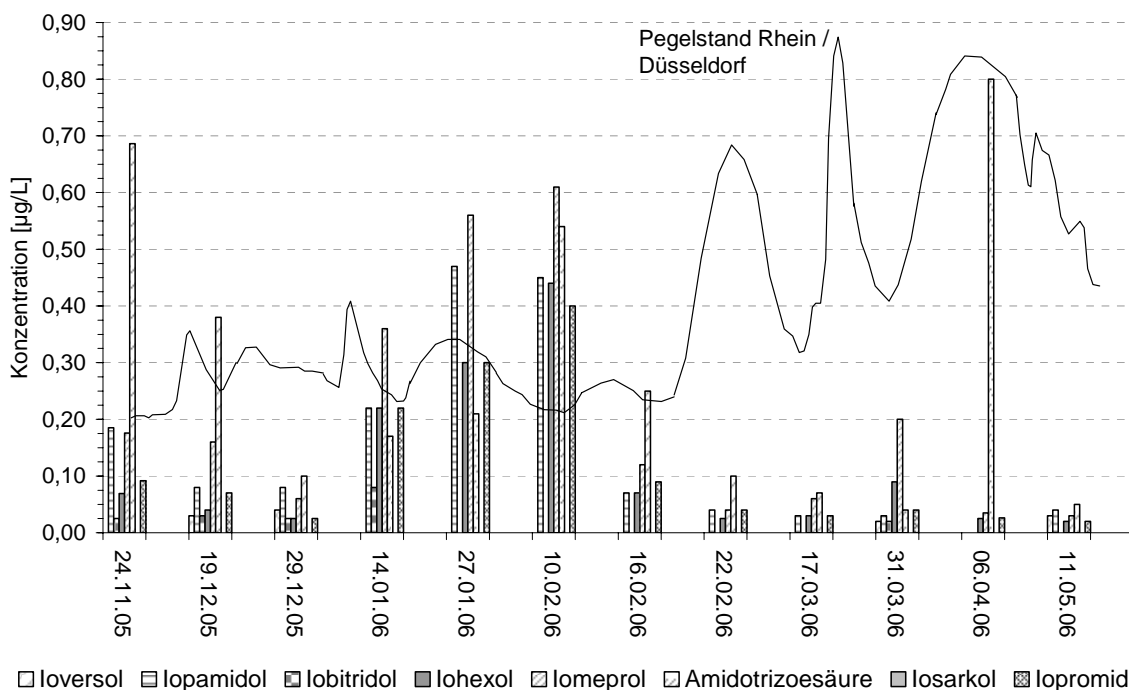


Abbildung 42: Ergebnisse der Untersuchung von Röntgenkontrastmittel im Rhein (Düsseldorf). Zum Vergleich ist der Pegelstand des Rheins ebenfalls eingezeichnet [33].

Auffallend bei allen drei Messstellen ist, dass ab Mitte Februar ein deutlicher Rückgang in den gemessenen Konzentrationen der einzelnen Kontrastmittel zu verzeichnen war. Grund für den Rückgang ist wahrscheinlich das seit Mitte Februar andauernde Hochwasser. Bei einem größeren Wasseraufkommen, das mit höheren Pegelständen einhergeht, verringern sich die Konzentrationen der iodierten Diagnostika. Interessant sind auch die niedrigen Ergebnisse der untersuchten Röntgenkontrastmittel um den Jahreswechsel. Ursache hierfür ist vermutlich ein

Rückgang der Patientenzahlen der Kliniken und Fachpraxen um Weihnachten und Neujahr.

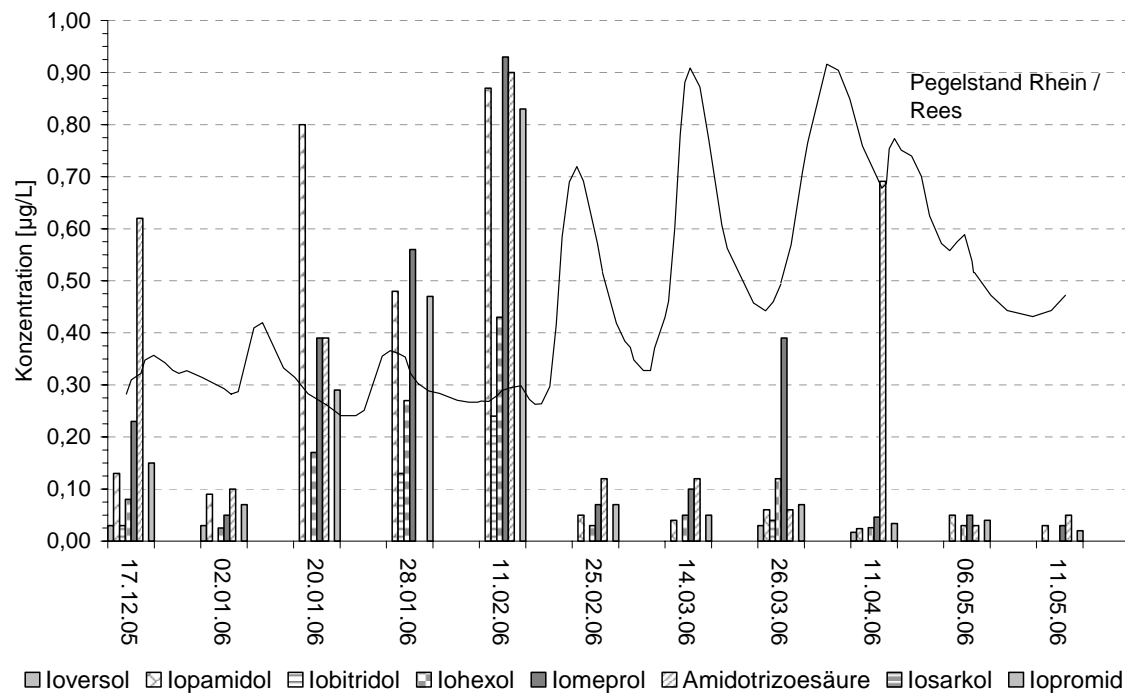


Abbildung 43: Ergebnisse der Untersuchung von Röntgenkontrastmittel im Rhein (Rees). Zum Vergleich ist der Pegelstand des Rheins ebenfalls eingezeichnet [33].

In der Abbildung 44 sind zur Veranschaulichung die Ergebnisse aus den Untersuchungen eingetragen. Neben den eigenen Untersuchungen wurden auch Ergebnisse aus der Literatur einbezogen. Man erkennt deutlich, dass die Gehalte der iodierten Röntgenkontrastmittel im Rhein stromabwärts zunehmen. Während bei Karlsruhe die niedrigsten Konzentrationen mit Medianwerten bis zu 0,11 µg/l bestimmt wurden, lagen die Konzentrationen stromabwärts bei Mainz schon bei Messwerten bis hin zu 0,15 µg/l. In Rees erreichten die Konzentrationen dann Werte bis hin zu 0,3 µg/l. Ausschlaggebend für den Zuwachs sind neben kommunalen Kläranlagen auch die in den Rhein fließenden Nebenflüsse mit hohem Abwasseranteil. Der Neckar zeigte Konzentrationen bis hin zu 0,49 µg/l. Der Fluss Main lieferte Konzentrationen bis zu 0,29 µg/l. Auch die mittleren Konzentrationen in der Ruhr lagen oberhalb derer des Rheins. Ein hoher Eintrag ist vermutlich auch auf den bislang nicht untersuchten stark abwasserhaltigen Emscherkanal zurückzuführen.

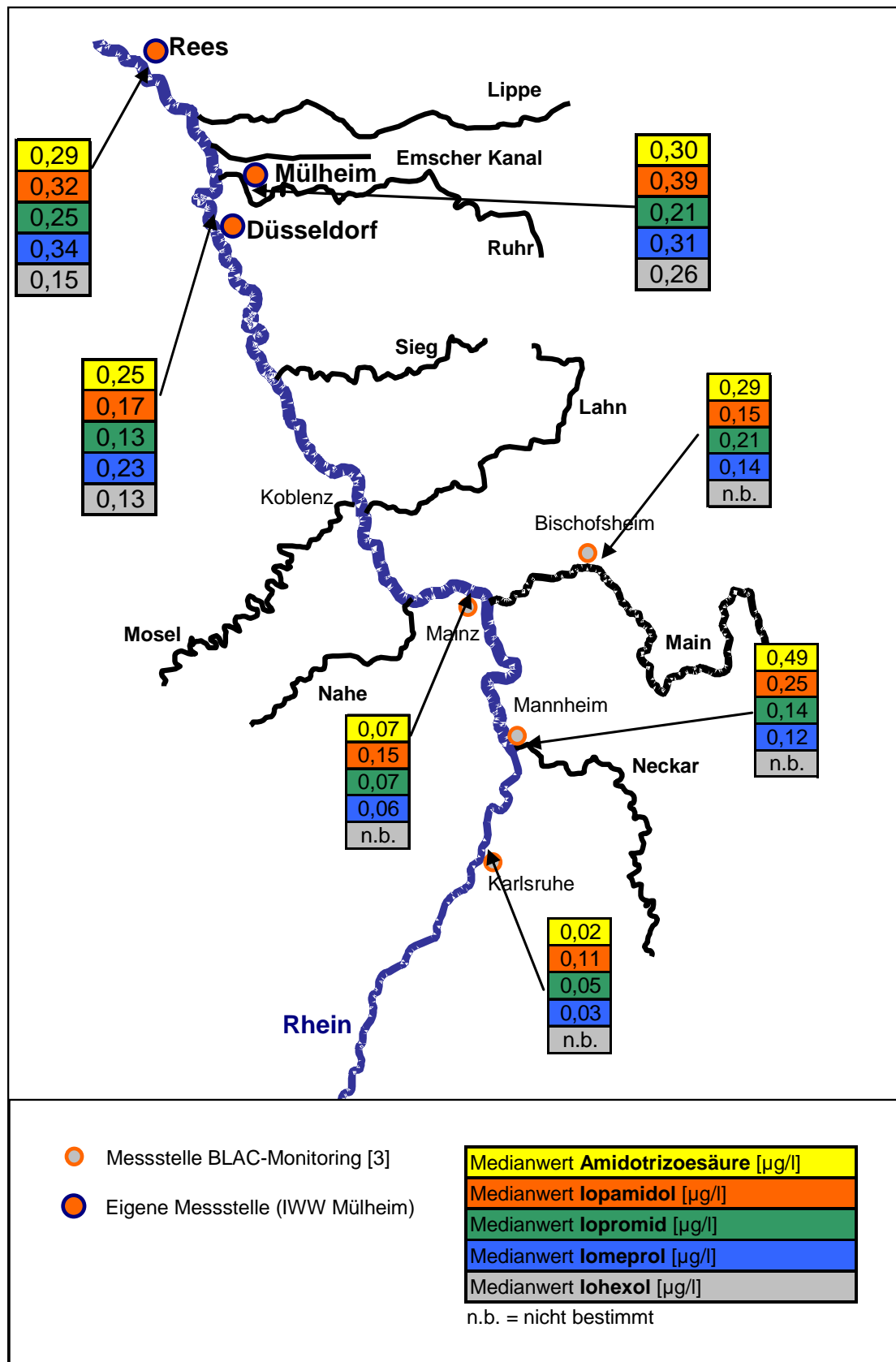


Abbildung 44: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse aus eigenen Untersuchungen, sowie Werte aus der BLAC-Studie.

In der Tabelle 34 sind die gemittelten Konzentrationen der einzelnen Röntgenkontrastmittel in der Ruhr und im Rhein angegeben. Aus den Daten und den jährlichen Abflussmengen wurden die jährlichen Frachten der Diagnostika nach Formel 1 ermittelt [34].

$$F = c \cdot Q \quad (\text{Formel 1})$$

F = mittlere jährliche Fracht [t/a]; c = Mittelwert der jährlichen Konzentration [mg/m³];
Q = mittlere jährliche Abflussmenge [m³]

Bei einer Abflussmenge des Rheins von 70 Mrd. m³/a ergibt das eine jährliche Summenfracht von etwa 80 Tonnen Röntgenkontrastmittel [35]. Für die Ruhr, mit einer Abflussmenge von 2,4 Mrd. m³/a, liegt der ermittelte Wert mit 3,7 Tonnen um einiges niedriger [36]. Die daraus resultierende Iodfracht beträgt somit etwa 40 Tonnen Iod für den Rhein und 1,9 Tonnen Iod für die Ruhr. Die jährliche AOX (adsorbierbare organische Halogenverbindungen)-Fracht des Rheins liegt bei 548 Tonnen [34]. Davon entfallen nach meinen Berechnungen etwa 7 % auf die untersuchten iodierten Röntgenkontrastmittel.

Tabelle 34: Zusammenfassung der gemittelten Konzentrationen und die daraus berechnete jährliche Fracht jedes einzelnen RKM in der Ruhr und im Rhein.

Arzneistoff	mittlere Konzentration der untersuchten RKM im Rhein n = 19 [mg/m ³]	errechnete jährliche RKM Fracht im Rhein [t/a]	mittlere Konzentration der untersuchten RKM in der Ruhr n = 8 [mg/m ³]	errechnete jährliche RKM Fracht in der Ruhr [t/a]
Ioversol	0.01	0.95	<BG	n.b.
Iopamidol	0.24	16.82	0.39	0.94
Iobitridol	0.04	2.56	0.08	0.19
Iohexol	0.14	9.72	0.26	0.62
Iomeprol	0.29	20.11	0.31	0.75
Amidotrizoesäure	0.27	19.02	0.30	0.72
Iosarkol	<BG	n.b.	<BG	n.b.
Iopromid	0.19	13.32	0.21	0.50
Iothalamicsäure	<BG	n.b.	<BG	n.b.
Iopentol	0.01	0.69	0.01	0.02
Iodixanol	<BG	n.b.	<BG	n.b.

<BG = kleiner Bestimmungsgrenze; n.b. = nicht berechnet

7.8 Untersuchungsprogramm ausgewählter Röntgenkontrastmittel in flussnahen Grundwassermessstellen während eines Hochwasserereignisses

Während eines Hochwasserereignisses wurden am Rhein an zwei Grundwassermessstellen monatlich über einen Zeitraum von vier Monaten Wasserproben genommen. Der Lageplan der Messstellen ist der Abbildung 12 unter Kapitel 6.9.1 zu entnehmen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der Abbildung 45 und Abbildung 46 dargestellt.

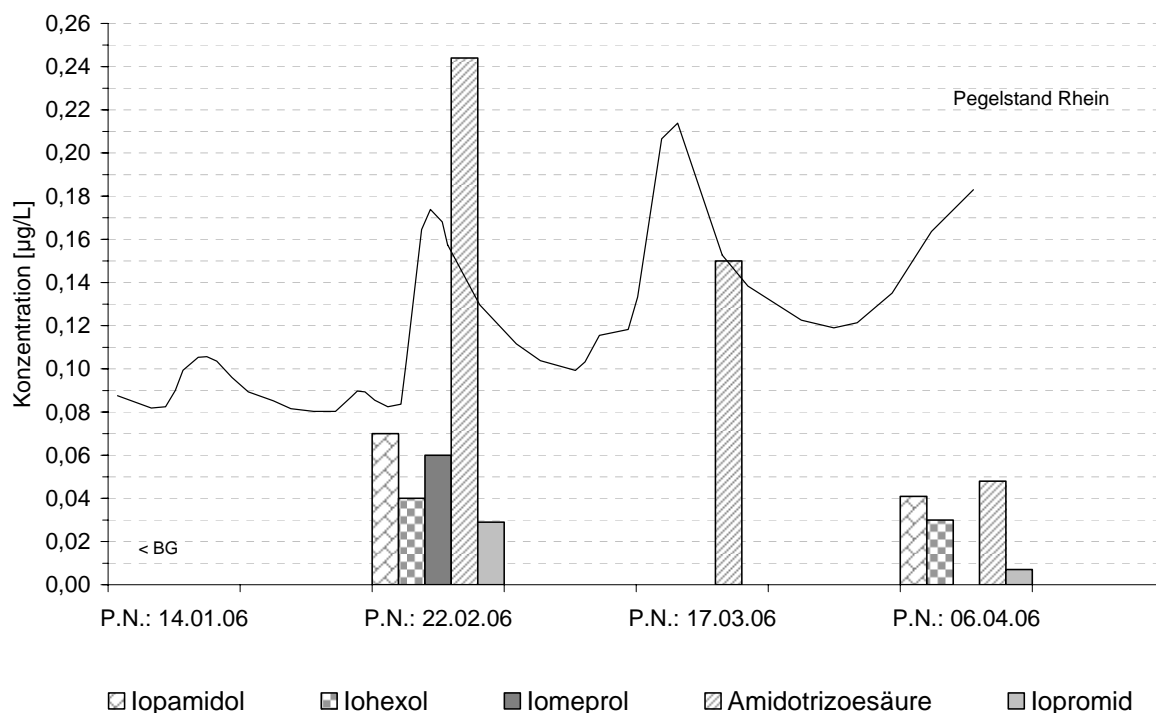


Abbildung 45: Ergebnisse der Untersuchung von Röntgenkontrastmittel in der Grundwassermessstelle GWM 1 (44 m entfernt vom Rhein). Zum Vergleich ist der Pegelstand des Rheins ebenfalls eingezeichnet [33].

Vor Einsetzen der Hochwasserperiode ergaben die Untersuchungen beider GWM keine positiven Befunde. Das änderte sich aber nach Beginn der Hochwasserperiode am 16.02.2006 schlagartig. In der GWM 1 (44 m vom Rhein entfernt) konnten bei der 2. Probennahme, 6 Tage nach Hochwasserbeginn, RKM in sehr hohen Konzentrationen bis zu 0,24 µg/l detektiert werden. Den maximalen Wert hatte die Amidotrizoesäure. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass dieser Stoff im Rhein mit am stärksten vertreten ist, ist dies nicht verwunderlich. Unter Bedingungen eines Hochwassers dringt das Wasser schnell in den Aquifer vor. Etwa ein Monat nach

Einsetzen der hohen Wasserführung zeigte auch die GWM 2 (480 m) einen positiven RKM Befund.

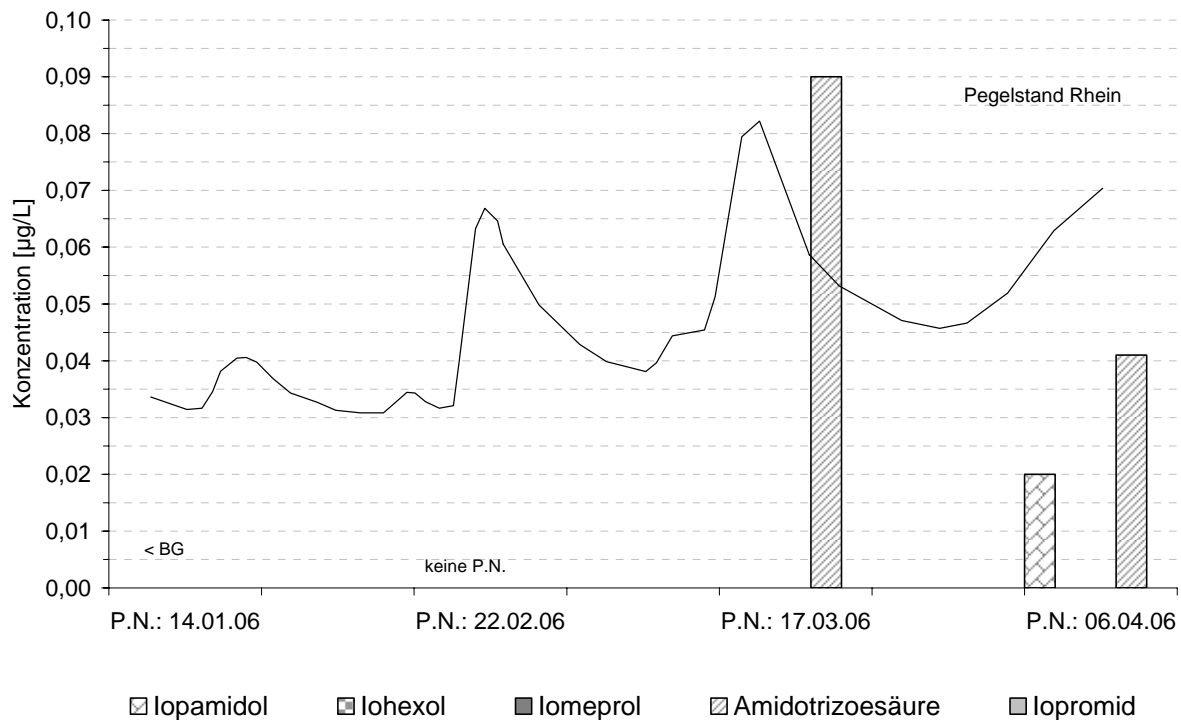


Abbildung 46: Ergebnisse der Untersuchung von Röntgenkontrastmittel in der Grundwassermessstelle 2 (480 m entfernt vom Rhein). Zum Vergleich ist der Pegelstand des Rheins ebenfalls eingezeichnet [33].

Es konnte hier die Amidotrizoesäure mit einer Konzentration von 0,09 µg/l detektiert werden. Die übrigen RKM lagen unterhalb ihrer Bestimmungsgrenzen. Die während des Hochwasserereignisses erhaltenen Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die RKM ein sehr gutes Verlagerungsverhalten im Aquifer besitzen.

7.9 Säulenversuche gefüllt mit unterschiedlichen Materialien

Um eine Aussage über die Verlagerungsverhalten der Röntgenkontrastmittel in Böden treffen zu können, wurden Bodensäulenversuche anhand zwei verschiedener Bodenarten durchgeführt. Von den anfallenden Sickerwasserproben wurden Einzelmessungen durchgeführt. Es konnten somit keine Standardabweichungen ermittelt werden. Aus den berechneten Wirkstoffkonzentrationen der Sickerwässer und den Angaben zum angefallenen Probenvolumen wurde die absolut ausgetragene Wirkstofffracht je Probennahme ermittelt. In den nachfolgenden Diagrammen (Abbildung 47 bis Abbildung 48) sind die Ergebnisse der beiden Bodensäulen („Uedorfer Boden = sandiger Boden“, „Meckenheimer Boden = toniger Schluff“) dargestellt.

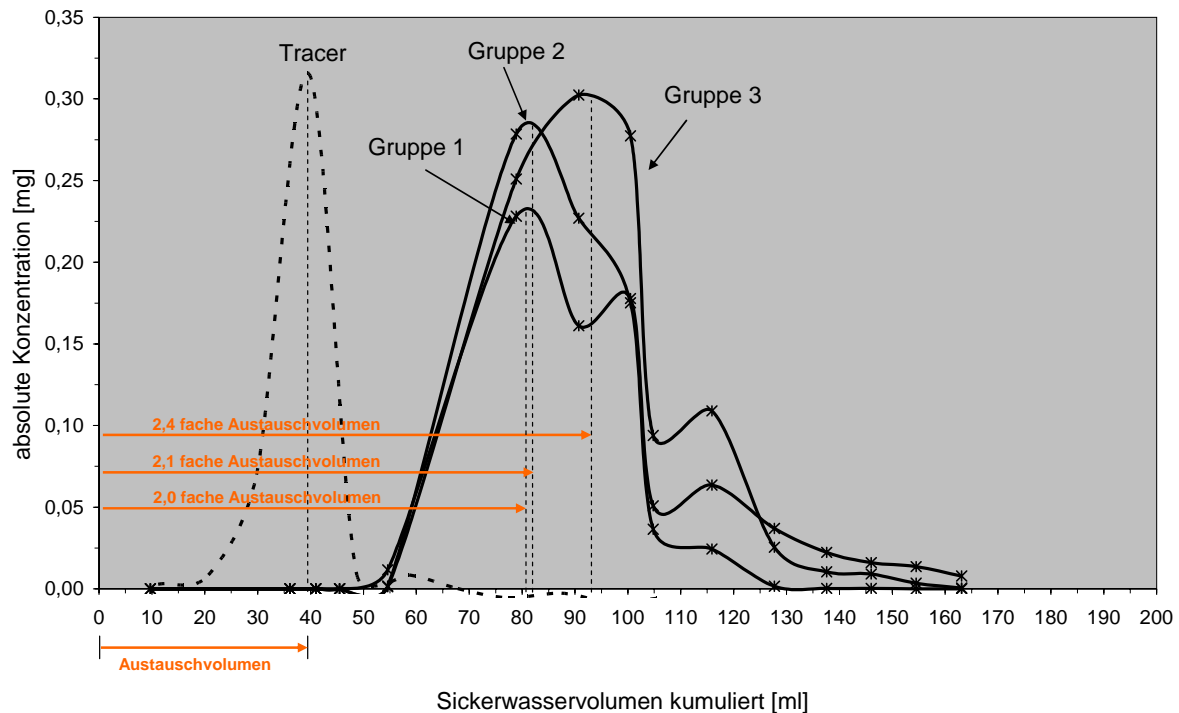


Abbildung 47: Graphische Darstellung der absoluten Arzneistofffrachten der Sickerwässer der Bodensäule gefüllt mit „Uedorfer Boden“ und das Ergebnis des Tracerversuchs.

Zur besseren Übersicht wurden die elf untersuchten Röntgenkontrastmittel in drei Stoffgruppen zusammengefasst. Die Gruppe 1 beinhaltet die beiden ionischen Röntgenkontrastmittel Amidotrizoesäure und Iothalamicsäure. Die Stoffgruppe 2 fasst die restlichen Kontrastmittel zusammen, mit Ausnahme des Iosarkols. Iosarkol bildet die dritte und letzte Gruppe.

Beide betrachteten Böden zeigen nach Ablauf der Probennahme einen Austrag aller untersuchten Stoffe im Sickerwasser. Während bei der „sandigen“ Bodensäule alle Röntgenkontrastmittel, mit Ausnahme des Arzneistoffs Iosarkol, annähernd zum gleichen Zeitpunkt (2,1 fache Porenvolumen) ausgetragen wurden, wiesen die Röntgenkontrastmittel, in der mit lehmigen Schluff gefüllten Säule, deutliche Unterschiede im Elutionsverhalten auf. Als erstes wurden die ionischen Diagnostika (Iothalamicsäure, Diatrizoat) nach einem Austausch von etwa der zweifachen Menge des Porenvolumens aus der „lehmigen“ Bodensäule ausgetragen. Danach folgte eine größere Gruppe, die ihr Maximum bei dem 3 fachen Porenvolumen aufwies. Am stärksten verzögert wurde der Stoff Iosarkol, der bereits in der „sandigen“ Säule einen gleichen Trend zeigte. Das Maximum der Durchbruchskurve lag bei der 3,6 fachen Menge des Porenvolumens.

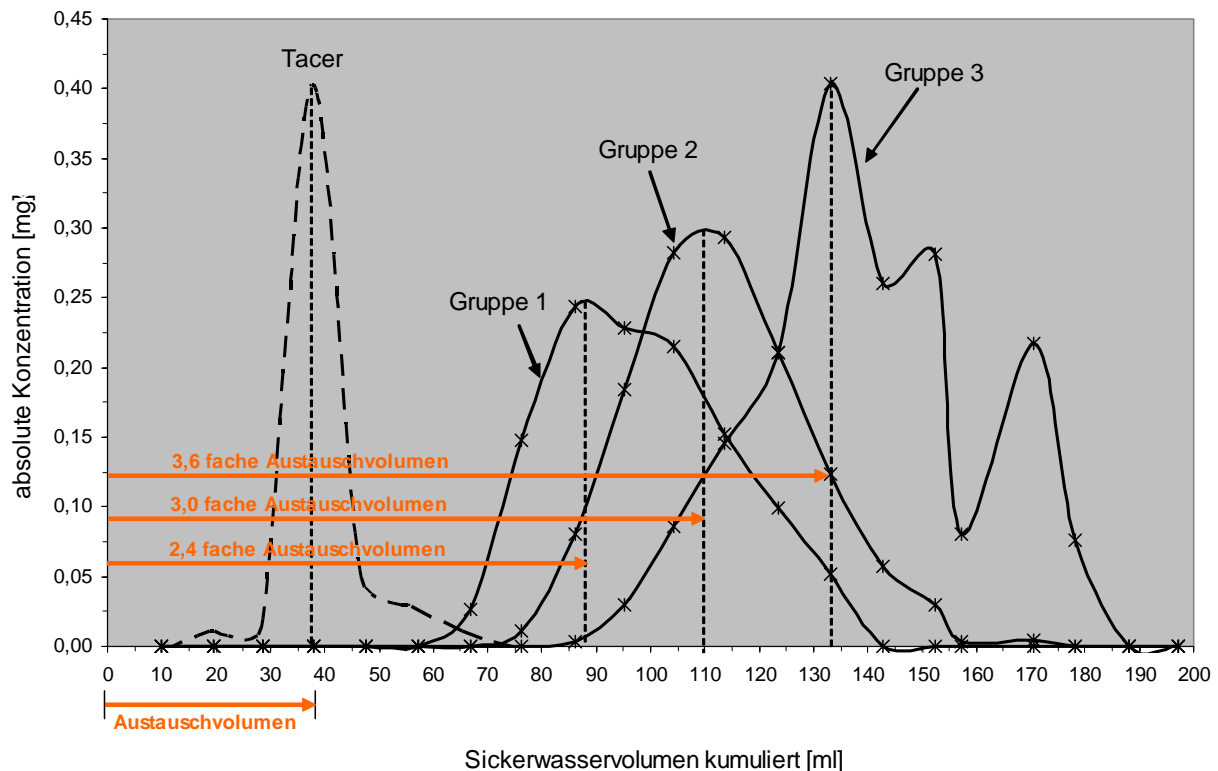


Abbildung 48: Graphische Darstellung der absoluten Arzneistofffrachten der Sickerwässer der Bodensäule gefüllt mit „Meckenheimer Boden“ und das Ergebnis des Tracerversuchs.

Ursache für das unterschiedliche Transportverhalten ist in den unterschiedlichen chemisch physikalischen Eigenschaften zu suchen. Die ionischen RKM werden von allen elf als erstes ausgetragen. Es ist anzunehmen, dass sie aufgrund ihres ionischen Charakters eine stärkere Polarität aufweisen als die übrigen Kontrastmittel und somit am schnellsten vom polaren Wasser ausgetragen werden. Zudem besitzen die beiden Stoffe die kleinste Molekülstruktur mit den kleinsten aliphatischen Seitenketten. Das gute Transportverhalten konnte auch anhand der Untersuchungen der GWM (Grundwassermessstellen) am Rhein gezeigt werden (Kapitel 7.8). Die GWM, die am weitesten vom Rheinufer entfernt lag, zeigte nur noch Befunde von Amidotrizoesäure.

Das Iosarkol hingegen besitzt die längste aliphatische Seitenkette, was die Wasserlöslichkeit verringern und die adsorptiven Eigenschaften am Boden erhöhen könnte. Daher wird es am langsamsten in den Bodensäulen verlagert.

Zusätzlich zum unterschiedlichen Transportverhalten der RKM konnten auch Unterschiede des Verlagerungsverhaltens in Abhängigkeit der Bodenbeschaffenheit

gezeigt werden. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass toniger Schluff eine stärkere Retention der Diagnostika verursacht als sandiger Boden.

7.10 Ermittlung des zeitlichen Verlaufs der Ausscheidung des RKM Iopromid über den menschlichen Harn

Die Abbildung 49 gibt die Ergebnisse der renalen Ausscheidung graphisch wieder. Die verwendeten Daten sind im Anhang unter Kapitel 9.1.19 zu entnehmen. Die Graphik zeigt deutlich, dass nach etwa 1 ½ Stunden der Injektion schon 46 % der applizierten Menge an Iopromid über den Harn ausgeschieden wurde. Nach ungefähr 20 Stunden wurde eine Ausscheidungsrate von 93 % erreicht.

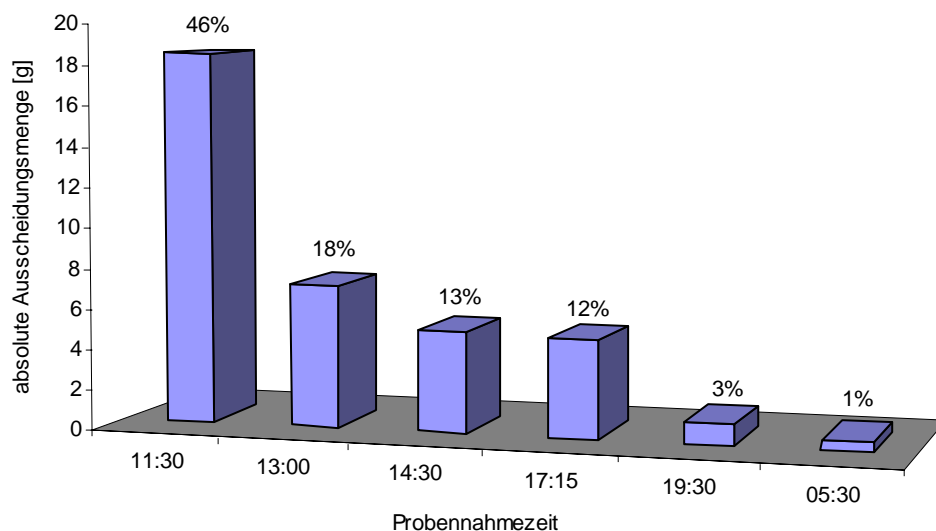


Abbildung 49: Graphische Darstellung der Ausscheidung des applizierten Röntgenkontrastmittel Iopromid über den menschlichen Harn (Applikation 10:00 Uhr).

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass Iopromid fast zur Gänze renal innerhalb von 24 Stunden ausgeschieden wurde. Dies zeigen auch andere nicht-ionische monomere wasserlösliche Röntgenkontrastmittel [11]. In Anlehnung an publizierten Ergebnissen konnte auch hier eine Halbwertszeit von etwa zwei Stunden ermittelt werden [37,38,39].

8 Zusammenfassung

In der medizinischen Diagnostik werden mit steigendem Gehalt ionische und nicht-ionische, iodierte Röntgenkontrastmittel (RKM) eingesetzt, die als schwer abbaubare Verbindung über die Abwasserreinigungsschiene in das Rohwasser der Trinkwassergewinnung gelangen können. Bei Konzentrationen im unteren $\mu\text{g/l}$ -Bereich sind spurenanalytische Methoden nach chromatographischer Trennung notwendig. Für elf iodierte RKM wurden Analyseverfahren im Hinblick auf hohe Nachweisempfindlichkeit und gute Trenneigenschaften entwickelt. Für matrixarme Wasserproben wurde als Methode der Wahl HPLC-MS nach vorheriger Festphasen-Extraktion (SPE) an einer Polystyrol-Divinylbenzol-Phase gefunden. Die Wiederfindung der Substanzen nach SPE liegt zwischen 30 % und 110 %.

Als beispielhafter Vertreter matrixreicher wässriger Proben wurde menschlicher Harn gewählt, da sowohl anorganische als auch organische Inhaltsstoffe Interferenzen, sowohl bei der Festphasenextraktion als auch bei der HPLC-MS, verursachen können. Die anorganischen Salze zeigten dabei die stärksten Signalunterdrückungen der Analyten. Da die anorganischen Salze jedoch durch die Festphasenextraktion von den Analyten im Vorfeld getrennt wurden, konnten nur noch die organischen Bestandteile des Harns weitere Probleme in der Analytik verursachen. Aus den Untersuchungen geht hervor, dass nicht die in vergleichsweise hohen Konzentrationen vorliegenden organischen Harninhaltsstoffe (Citronensäure, Kreatinin, Harnstoff) die störenden Komponenten in der Analytik sind. Die im Harn enthaltenen Proteine hingegen, zeigen Auswirkungen auf die Signalintensität der RKM.

Die Erkenntnisse aus dem Studium der Matrixeffekte zeigten, dass für die Bestimmung der ausgewählten RKM in matrixreichen Wasserproben (menschlicher Harn) eine Variation des Analyseverfahrens zwingend erforderlich ist. Eine gleichzeitige Anreicherung der organischen Matrixbestandteile der Probe, führte sowohl zu Verstopfungen im Einleitungssystem des Massenspektrometers als auch zur Signalunterdrückung der Analyten. Daher wurde das zu extrahierende Probenvolumen auf 10 ml Harn begrenzt. Um die Konzentration der üblicherweise in Harn enthaltenen hohen Salzfrachten möglichst gering zu halten, wurde die Harn-Probe vor der Festphasenextraktion stark verdünnt. Der erhaltene Extrakt wurde durch ein anschließendes „clean-up“-Verfahren über eine Aminopropyl-Kieselgel-Phase von den organischen Matrixbestandteilen (Hauptkomponente vermutlich Urobilin) getrennt. Aufgrund unterschiedlicher chemischer Eigenschaften der ionischen und nicht-ionischen RKM musste nach dem „clean-up“ getrennt weiter verfahren werden. Die ionischen RKM wurden an der Aminopropyl-Kieselgel-Phase nicht angereichert

und mussten direkt analysiert werden. Die angereicherten nicht-ionischen RKM wurden von der störenden Matrix getrennt eluiert und anschließend vermessen.

Im Rahmen eines etwa 5 monatigen Monitoring-Programms wurde das Vorkommen iodierter Röntgenkontrastmittel in den Flüssen Rhein und Ruhr studiert. Es zeigte sich, dass in allen entnommenen Proben mindestens 7 der 11 untersuchten Diagnostika nachgewiesen werden konnten. Die Ergebnisse in der Ruhr ergaben im Durchschnitt höhere Konzentrationen als die gefundenen Gehalte im Rhein. Die Stoffe Iopamidol, Iomeprol und die Amidotrizoesäure waren in der Ruhr mit Mittelwerten von 0,30 µg/l bis 0,39 µg/l am stärksten vertreten. Aber auch Iohexol und Iopromid konnten mit Mittelwerten zwischen 0,21 µg/l und 0,26 µg/l bestimmt werden. In einigen Proben wurden Iopentol und Iobitridol nachgewiesen. Die beiden Messstellen am Rhein lieferten ähnliche Ergebnisse für die Gehalte der elf RKM. Auch hier zeigten die Stoffe Iopamidol, Iomeprol, Amidotrizoesäure, Iopromid und Iohexol im Wasser die höchsten Konzentrationen. Auffällig ist, dass stromabwärts bei Rees die untersuchten Wasserproben im Mittel höhere Konzentrationen an RKM aufwiesen als die Rheinproben bei Düsseldorf. Aus den Ergebnissen des Monitoring-Programms lassen sich jährliche Röntgenkontrastmittelfrachten von 80 Tonnen für den Rhein und 3,7 Tonnen für die Ruhr errechnen.

Zusätzlich wurde das Transportverhalten der elf RKM in der Bodenpassage studiert. Dazu wurden im Labormaßstab Bodensäulenversuche anhand zweier verschiedener Bodenarten durchgeführt. Bei den Bodenarten handelt es sich um einen sandigen Boden und einen tonigen Schluff. Während beim sandigen Boden annähernd alle elf RKM zum gleichen Zeitpunkt ausgetragen wurden, wiesen die RKM in mit lehmigen Schluff gepackten Säulen deutliche Unterschiede im Transportverhalten auf. Tendenziell zeigen die Ergebnisse, dass ionische RKM ein besseres Transportverhalten besitzen als nicht ionische RKM. Am langsamsten wird das Iosarkol im Boden verlagert. Zusätzlich zum unterschiedlichen Transportverhalten der RKM konnten auch Unterschiede des Verlagerungsverhaltens in Abhängigkeit von der Bodenbeschaffenheit gezeigt werden. Toniger Schluff verursacht eine stärkere Retention der Diagnostika als sandiger Boden.

Das im Labormaßstab gezeigte gute Transportverhalten der RKM konnte anhand eines Monitorings an zwei flussnahen Grundwassermessstellen (GWM) am Rhein während eines Hochwasserereignisses bestätigt werden. Vor Beginn des Hochwassers wurden keine RKM in den Wasserproben der beiden GWM (44 m und 480 m vom Rhein entfernt) nachgewiesen. Schon 6 Tage nach Hochwasserbeginn ergaben Untersuchungen an der GWM 1 (44 m) hohe Konzentrationen der auch im Rhein stark vertretenen RKM. Etwa 1 Monat nach Einsetzen der hohen Wasserführung zeigte auch die GWM 2 (480 m) einen positiven RKM Befund.

Literatur

- [1] Stan, H.-J., Heberer, Th. u. Linkerhägner, M.: Vorkommen von Clofibrinsäure im aquatischen System - Führt die therapeutische Anwendung zu einer Belastung von Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser? Vom Wasser 83, S. 57-68, (1994).
- [2] Heberer, T. u. Stan, H.-J.: Arzneimittelrückstände im aquatischen System. Wasser & Boden 50 (4), S. 20-25, (1998).
- [3] Hirsch, R., Ternes, Th. A., Haberer, K. u. Kratz, K.-L.: Nachweis von Beta-blockern und Bronchospasmolytika in der aquatischen Umwelt. Vom Wasser 87, S. 263-274, (1996).
- [4] Stumpf, M., Ternes, Th. A., Haberer, K., Seel, P. u. Baumann, W.: Nachweis von Arzneimittelrückständen in Kläranlagen und Fließgewässern. Vom Wasser 86, S. 291-303, (1996).
- [5] Butzen, A., Balsaa, P., Werres, F., Kuß, H.-M.: Iodierte Röntgenkontrastmittel in den Flüssen Ruhr und Rhein – Ergebnisse eines Monitoring-Programms. In Vorbereitung.
- [6] Feuerpfeil, I., López-Pila, J., Schmidt, R., Schneider, E. u. Szewzyk, R.: Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 42, 37-50 (1999).
- [7] Doll, T. E., Frimmel, F. H.: Verhalten von Carbamazepin, Clofibrinsäure, Iomeprol und Iopromid in der Umwelt – Fotochemischer Abbau mittels simulierter solarer UV-Strahlung. Vom Wasser, 100, Seite 99-110, 2003.
- [8] Kalsch, W: Biodegradation of the iodinated X-ray contrast media diatrizoat and iopromide. The Science of the Total Environment, 225, Seite 143-153, 1999.
- [9] Steger-Hartmann, Th., Länge, R., Schweinfurth, H., Tschampel, M., Rehmann, I.: Investigations into the environmental fate and effects of iopromide (ultravist), a widely used iodinated X-ray contrast medium. Water Research, 36, Seite 266-274, 2002.
- [10] Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln, Arzneimittelgesetz (AMG) vom 11. Dez. 1998 (BGBl. I S. 3586), zuletzt geändert durch Artikel 2 des Gesetzes zur Änderung des Apothekengesetzes vom 21. Aug. 2002 (BGBl. I S. 3352).
- [11] Wild, C.: Nicht-Ionische Röntgenkontrastmittel. Klinische Relevanz der Unterschiede verschiedener Kontrastmittel. Vorbereitungspapier für Konsensuskonferenz. Studie im Auftrag des Wiener Krankenanstalten-Verbundes. Institut für Technikfolgen-Abschätzung. Wien, November 2003.

-
- [12] Putschew, A., Jekel, M.: Iodierte Röntgenkontrastmittel im anthropogenen beeinflussten Wasserkreislauf. Vom Wasser, 97, 103-114, 2001.
- [13] AWBR: Iodierte Röntgenkontrastmittel. Jahresbericht Kapitel 1, Seite 75 ff. 2002.
- [14] Schlüter, St.: Schilddrüsenfunktionsänderungen nach Gabe jodhaltiger Röntgenkontrastmittel bei Coroarangiographien und PTCA: Eine prospektive Studie an 102 Patienten. Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Giessen, 1998.
- [15] Material Safety Data Sheet – in compliance with 93/112/EEC Directive, date of issue: September 1997.
- [16] Länge, R., Steger-Hartmann, Th.: Umweltrisikobewertung von Arzneimittelwirkstoffen: Beispiele aus der Praxis eines Herstellers. Texte: Arzneimittel in der Umwelt – Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen Sie das Umweltbundesamt. ISSN 0722-186X, S. 203- 215, 2005.
- [17] Steger-Hartmann, Th., Länge, R., Schweinfurth, H., Tschampel, M., Rehmann, I.: Investigations into the environmental fate and effects of iopromide (utrovist), a widely used iodinated X-ray contrast medium. Water Research 36, S. 266-274, 2002.
- [18] Verwaltungsvorschrift wassergefährdende Stoffe: Allgemeine Verwaltungsvorschrift zum Wasserhaushaltsgesetz über die Einstufung wassergefährdender Stoffe in Wassergefährdungsklassen, 17.Mai 1999.
- [19] Römpps Chemie-Lexikon, 8. Auflage, ISBN 3-440-04513-7, S.1627- 1628, 1983.
- [20] Skoog, D. A., Leary, J. J.: Instrumentelle Analytik; Grundlagen - Geräte – Anwendungen. Springer-Verlag, ISBN 3-540-60450-2, 1996.
- [21] Enke, Ch. G.: A Predictive Model for Matrix and Analyte Effects in Electrospray Ionization of Singly-Charged Ionic Analytes. Analytical Chemistry, Vol. 69, Nr. 23, S. 4885-4893, 1997.
- [22] Kebarle, P., Tang, L.: From ions in solution to ions in the Gas phase – The mechanism of electrospray mass spectrometry. Analytical chemistry, Vol. 65, Nr. 22, S. 972 A- 986 A, 1993.
- [23] Schulungsmaterial Thermo.
- [24] Smeraglia, J., Baldrey, S. F., Watson, D.: Matrix effects and selectivity Issues in LC-MS-MS. Chromatographia Supplement, Vol. 55, S. 95-99, 2002.

-
- [25] Stüber, M.: Vorkommen und Verhalten von Naphtalinsulfonaten in der biologischen Abwasserbehandlung. Dissertation, Fakultät III – Prozesswissenschaften – der Technischen Universität Berlin, 2005.
- [26] Karlson, P.: Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 11. Auflage, 1980.
- [27] Butzen, A., Balsaa, P., Werres, F., Kaub, J. M., Londong, J.: "Fortführung der Säulenversuche aus dem Forschungsprojekt „Lambertsmühle“ mit dem Ziel einer Abschätzung möglicher Gefährdungspotentiale durch den Eintrag von Pharmaka in den Grundwasserleiter". Abschlussbericht im Auftrag des Ministeriums für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen, Dezember 2005.
- [28] Mersmann, P.: Transport- und Sorptionsverhalten der Arzneimittelwirkstoffe Carbamazepin, Clofibrinsäure, Diclofenac, Ibuprofen und Propyphenazon in der wassergesättigten und –ungesättigten Zone. Dissertation an der Technischen Universität Berlin. 141 Seiten, 2003.
- [29] Pérez, S., Eichhorn, P., Celiz Dawn, M., Aga, D. S.: Structural Characterization of Metabolites of the X-ray Contrast Agent Iopromide in Activated Sludge Using Ion Trap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 78, 1866-1874, 2006.
- [30] Hirsch, R., Ternes, Th. A., Lindart, A., Haberer, K., Wilken, R.-D.: A sensitive method for the determination of iodine containing diagnostics agents in aqueous matrices using L-electrospray-tandem-MS detection. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 366, 8, S. 835 – 841, 2000.
- [31] Sacher, F., Lange, F. Th., Brauch, H.-J., Blankenhorn, I.: Pharmaceuticals in groundwaters Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of Chromatography A*, 938, S. 199-210, 2001.
- [32] Arbughi, T., Bertani, F., Celeste, R., Tirone, P.: High-performance liquid chromatographic assay of the X-ray contrast agent iopipridol in plasma and urine of rats and humans. *Journal of Chromatography B*, 729, S. 323-332, 1999.
- [33] Pegelstände: www.elwis.de/gewaesserkunde/Wasserstaende Elektronisches Wasserstraßen-Informationssystem (ELWIS). Wasser und Schifffahrtsverwaltung des Bundes.
- [34] Fleig, M.: Frachtabschätzung – Methoden und Vergleich. ARW Jahresbericht, ISSN 0343-0391, S. 63-78, 2001.

- [35] Rusche, J: Risikopotentiale der Reviere Rhein und Donau. Bundesverband der Deutschen Binnenschiffahrt e. V. Duisburg. Flussskaskotagung, S. 111-130, April 2002.
- [36] www.ruhrverband.de
- [37] Krause, W., Press, W. R., Frenzel, T.: Preclinical testing of iopromide. 1st communication: pharmacological evaluation. *Arzneimittelforschung* 44, 1162 – 1166, 1994.
- [38] Krause, W., Schobel, C., Press, W. R.: Preclinical testing of iopromide. 2nd communication: toxicological evaluation. *Arzneimittelforschung* 44, 1275 – 1279, 1994.
- [39] Krause, W., Schuhman-Gampieri, G.: Pharmacokinetics of contrast media. In: Dawson, P., Clauss, W., eds.: *Contrast media in practice. Questions and answers*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag: 26 – 34, 1993.

9 Anhang

9.1 Datensammlung der in der Arbeit verwendeten Abbildungen

9.1.1 Einfluss der Ameisensäurekonzentration des Laufmittels auf die Signalintensität der Analyten

RKM	0,1 Vol.-%	0,25 Vol.-%	0,5 Vol.-%
	Ameisensäurekonzentration	Ameisensäurekonzentration	Ameisensäurekonzentration
	(n=3) [%]	(n=3) [%]	(n=3) [%]
loversol	50	74	100
lopamidol	32	59	100
lobitridol	46	66	100
lohexol	45	67	100
lomeprol	57	74	100
Amidotrizoesäure	22	54	100
losarkol	33	46	100
lopromid	60	78	100
lothalamicsäure	9	46	100
lopentol	52	51	100
lodixanol	44	52	100

9.1.2 Ergebnisse der Untersuchung zur Signalunterdrückung bei Anwesenheit von NaCl

RKM	NaCl Konzentration [mg/l]											
	0,000	0,005	0,025	0,050	0,075	0,100	0,250	0,500	0,750	1,000	2,500	4,000
	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)
	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %
loversol	100	100	83	85	75	79	65	65	53	51	40	43
lopamidol	100	115	107	115	116	121	118	112	99	91	71	70
lobitridol	100	99	94	103	97	101	94	109	101	98	83	102
lohexol	100	97	100	98	96	104	90	99	88	89	76	94
lomeprol	100	103	100	101	94	101	91	100	89	94	79	89
Amidotrizoesäure	100	95	90	103	112	111	65	73	57	43	0	0
losarkol	100	107	93	89	89	81	87	58	55	35	26	15
lopromid	100	108	105	104	100	108	92	87	90	108	101	124
lothalamicsäure	100	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	65	27	76	66	0	0
lopentol	100	102	93	102	94	101	88	85	107	97	79	51
lodixanol	100	102	91	91	89	0	102	89	140	129	118	75

k.A.=keine Angabe!

9.1.3 Ergebnisse der Untersuchung zur Signalunterdrückung bei Anwesenheit von KHSO_4

RKM	KHSO ₄ Konzentration [mg/l]												
	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	1,00	1,50	2,00	2,50	3,00	3,50	4,00
	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)
	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %
Ioversol	100	64	52	55	52	57	56	43	44	32	37	33	35
Iopamidol	100	69	70	82	79	85	85	71	70	53	62	57	59
Iobitridol	100	101	102	102	100	107	103	86	90	80	80	66	77
Iohexol	100	102	94	94	99	99	85	77	81	74	74	60	68
Iomeprol	100	108	101	106	103	113	98	82	86	81	83	67	80
Amidotrizoesäure	100	94	79	79	49	48	0	0	0	0	0	0	0
Iosarkol	100	96	90	102	94	92	84	71	80	78	72	57	66
Iopromid	100	109	104	112	109	113	105	92	98	78	83	69	78
Iothalamicsäure	100	98	70	67	38	34	0	0	0	0	0	0	0
Iopentol	100	94	86	101	98	101	102	81	99	82	86	85	89
Iodixanol	100	84	80	91	86	0	94	80	86	77	88	88	86

9.1.4 Ergebnisse der Untersuchung zur Signalunterdrückung bei Anwesenheit von KH_2PO_4

RKM	KH ₂ PO ₄ Konzentration [mg/l]									
	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	1,00	2,00	3,00	4,00
	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)
	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %
Ioversol	100	92	80	80	79	71	54	50	33	29
Iopamidol	100	109	101	90	98	92	80	69	51	45
Iobitridol	100	103	95	95	97	99	75	85	63	66
Iohexol	100	97	99	100	99	93	67	71	52	51
Iomeprol	100	109	110	101	105	103	79	86	69	69
Amidotrizoesäure	100	109	101	117	109	90	47	0	38	0
Iosarkol	100	108	105	95	107	105	76	74	57	69
Iopromid	100	113	102	104	104	103	83	97	73	88
Iothalamicsäure	100	98	89	82	81	79	73	0	12	0
Iopentol	100	107	101	101	101	102	88	111	0	93
Iodixanol	100	97	101	93	101	89	98	106	79	96

9.1.5 Ergebnisse der Untersuchung zur Signalunterdrückung bei Anwesenheit von Citronensäure

RKM	Citronensäure Konzentration [mg/l]					
	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)
	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %
loversol	100	54	51	43	41	39
lopamidol	100	85	59	47	43	41
lobitridol	100	89	98	89	86	83
lohexol	100	85	92	84	83	75
lomeprol	100	88	99	89	84	80
Amidotrizoesäure	100	107	102	111	110	108
losarkol	100	96	97	82	87	84
lopromid	100	90	101	98	90	91
lothalamicsäure	100	96	97	91	88	91
lopentol	100	92	95	88	91	81
lodixanol	100	0	89	85	78	81

9.1.6 Ergebnisse der Untersuchung zur Signalunterdrückung bei Anwesenheit von Kreatinin

RKM	Kreatinin Konzentration [mg/l]					
	0,00	0,30	0,60	0,90	1,20	1,50
	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)
	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %
loversol	100	96	93	98	93	88
lopamidol	100	102	96	100	90	82
lobitridol	100	90	93	95	90	90
lohexol	100	94	96	100	94	94
lomeprol	100	95	97	105	93	102
Amidotrizoesäure	100	111	117	121	115	107
losarkol	100	88	82	75	64	74
lopromid	100	96	95	93	94	97
lothalamicsäure	100	104	101	102	104	106
lopentol	100	94	100	93	94	101
lodixanol	100	104	95	97	96	106

9.1.7 Ergebnisse der Untersuchung zur Signalunterdrückung bei Anwesenheit von Harnstoff

RKM	Harnstoff Konzentration [mg/l]									
	0,0	0,1	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0
	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)	(n=1)
	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %	WDF in %
loversol	100	87	67	54	51	27	42	45	39	43
lopamidol	100	79	52	42	35	18	31	33	30	29
lobitridol	100	91	75	59	57	27	39	44	40	42
lohexol	100	94	66	52	56	26	40	42	39	41
lomeprol	100	99	69	54	53	20	31	35	32	34
Amidotrizoesäure	100	91	75	62	62	39	53	58	64	75
losarkol	100	102	91	84	78	75	66	54	54	55
lopromid	100	103	72	62	53	30	42	44	49	51
lothalamicsäure	100	116	70	56	49	31	38	45	45	42
lopentol	100	86	81	69	64	68	68	66	52	52
lodixanol	100	100	106	104	91	95	105	88	94	93

9.1.8 Ergebnisse zu den durchgeführten Aussalzversuchen

RKM	- g/l NaCl*	2,5 g/l NaCl	5 g/l NaCl
	(n=3)	(n=3)	(n=3)
	WDF [%]	WDF [%]	WDF [%]
loversol	100	80	64
lopamidol	100	83	66
lobitridol	100	97	80
lohexol	100	95	79
lomeprol	100	95	81
Amidotrizoesäure	100	98	86
losarkol	100	60	50
lopromid	100	103	100
lothalamicsäure	100	99	91
lopentol	100	87	75
lodixanol	100	94	87

* = normiert auf 100 %

9.1.9 Ermittlung der Wiederfindungsraten vor und nach einer Glasfaserfiltration

RKM	vor Glasfaserfiltration (n=3) WDF [%]	nach Glasfaserfiltration (n=3) WDF [%]
loversol	100	98
lopamidol	100	99
lobitridol	100	96
lohexol	100	96
lomeprol	100	96
Amidotrizoesäure	100	102
losarkol	100	95
lopromid	100	101
lothalamicsäure	100	101
lopentol	100	99
lodixanol	100	96

9.1.10 Einfluss der organischen Harn-Inhaltsstoffe auf die Wiederfindung der Analyten im Extrakt.

Arzneistoff	Kreatininextrakt (n=3) WDF [%]	Citronensäureextrakt (n=3) WDF [%]	Harnstoffextrakt (n=3) WDF [%]	Harnextrakt (n=3) WDF [%]
loversol	41	43	37	2
lopamidol	59	59	53	2
lobitridol	96	99	81	5
lohexol	96	101	82	3
lomeprol	96	97	77	1
Amidotrizoesäure	125	110	130	6
losarkol	51	52	47	n.B
lopromid	120	110	94	5
lothalamicsäure	130	120	115	3
lopentol	57	56	50	n.B
lodixanol	77	75	73	n.B

n.B.=konnten nicht bestimmt werden!

9.1.11 Einfluss der Verdünnung der Harnprobe auf die Anreicherung der Analyten

RKM	1000 ml (n=3) WDF [%]	750 ml (n=3) WDF [%]	500 ml (n=3) WDF [%]	250 ml (n=3) WDF [%]
loversol	1,1	0,7	0,5	0,4
lopamidol	1,1	0,9	0,6	0,5
lobitridol	2,3	1,7	1,6	1,4
lohexol	0,8	0,7	0,6	0,5
lomeprol	0,8	0,7	0,6	0,5

9.1.12 Einfluss eines vor der Anreicherung durchgeführten „Clean-up's“ auf die Wiederfindung (WDF) der Analyten in menschlichen Harn

RKM	Wasser (n=2) WDF [%]	Harn ohne clean up (n=1) WDF [%]	Harn Florisil (pH 9) (n=1) WDF [%]	Harn Eiweißfällung (n=1) WDF [%]	Harn Ionentauscher (n=1) WDF [%]	Harn NH ₂ (n=1) WDF [%]
loversol	100	11	14	19	2	25
lopamidol	100	10	13	15	3	25
lobitridol	100	7	7	8	7	38
lohexol	100	10	11	13	4	25
lomeprol	100	10	10	10	3	23
Amidotrizoesäure	100	0	0	0	0	0
losarkol	100	0	0	1	0	62
lopromid	100	5	6	7	3	61
lothalamicsäure	100	0	0	0	0	0
lopentol	100	3	5	4	1	76
lodixanol	100	1	0	1	0	79

WDF= Wiederfindung

9.1.13 Wiederfindung der untersuchten RKM im Extrakt nach Reinigung über NH₂-Kartusche

RKM	Wasser ohne NH ₂ -Filtration (n=1) WDF [%] normiert	Wasser nach NH ₂ -Filtration (n=1) WDF [%]
loversol	100	89
lopamidol	100	99
lobitridol	100	89
lohexol	100	103
lomeprol	100	95
Amidotrizoesäure	100	0
losarkol	100	98
lopromid	100	89
lothalamicsäure	100	0
lopentol	100	102
lodixanol	100	101

9.1.14 Ergebnisse der Untersuchung von RKM in der Ruhr (Mülheim)

[illegible]

9.1.15 Ergebnisse der Untersuchung von RKM im Rhein (Düsseldorf)

[illegible]

9.1.16 Ergebnisse der Untersuchung von RKM im Rhein (Rees)

[illegible]

9.1.17 Ergebnisse der Untersuchung von RKM am Rhein in GWM 1

RKM	Konzentration P.N.: 14.01.06 [µg/l]	Konzentration P.N.: 22.02.06 [µg/l]	Konzentration P.N.: 17.03.06 [µg/l]	Konzentration P.N.: 06.04.06 [µg/l]
loversol	< BG	< BG	< BG	< BG
lopamidol	< BG	0,07	< BG	0,04
lobitridol	< BG	< BG	< BG	< BG
lohexol	< BG	0,04	< BG	0,03
lomeprol	< BG	0,06	< BG	< BG
Amidotrizoesäure	< BG	0,24	0,15	0,05
losarkol	< BG	< BG	< BG	< BG
lopromid	< BG	0,03	< BG	0,01
lothalamicsäure	< BG	< BG	< BG	< BG
lopentol	< BG	< BG	< BG	< BG
lodixanol	< BG	< BG	< BG	< BG

9.1.18 Ergebnisse der Untersuchung von RKM am Rhein in GWM 1

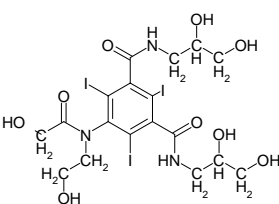
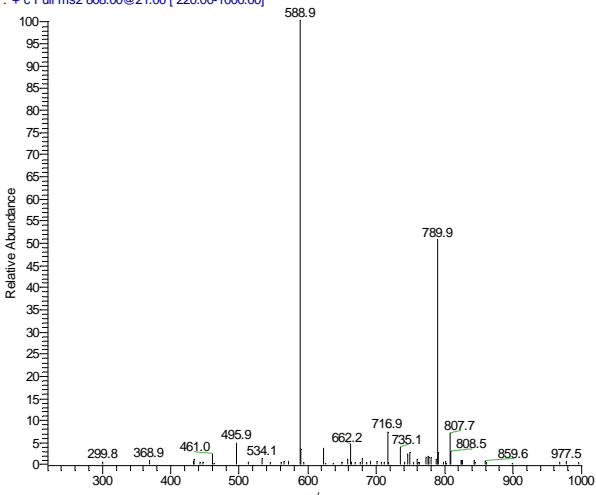
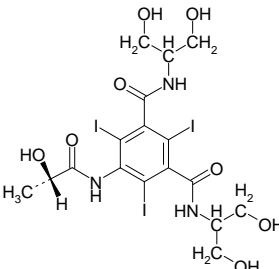
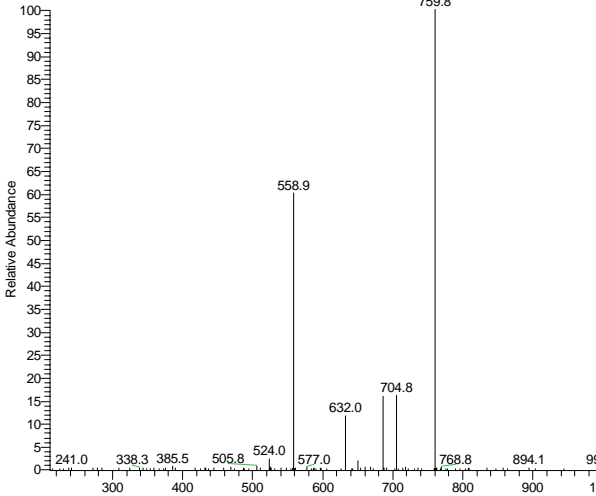
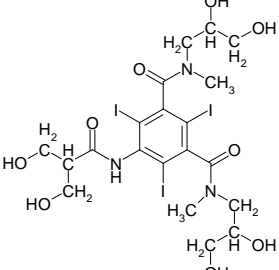
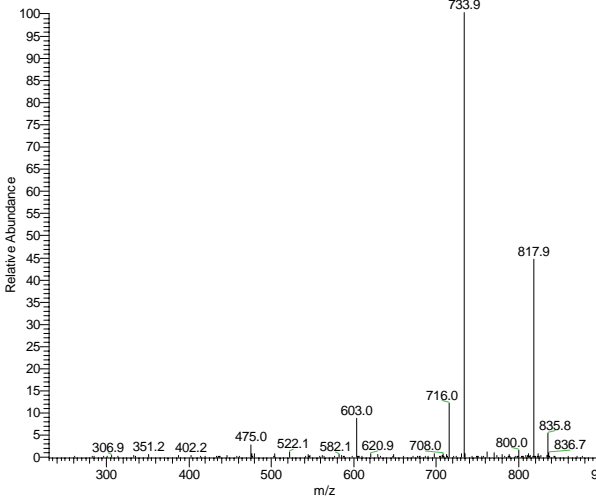
RKM	Konzentration P.N.: 14.01.06 [µg/l]	Konzentration P.N.: 22.02.06 [µg/l]	Konzentration P.N.: 17.03.06 [µg/l]	Konzentration P.N.: 06.04.06 [µg/l]
loversol	< BG	k.P	< BG	< BG
lopamidol	< BG	k.P	< BG	0,02
lobitridol	< BG	k.P	< BG	< BG
lohexol	< BG	k.P	< BG	< BG
lomeprol	< BG	k.P	< BG	< BG
Amidotrizoesäure	< BG	k.P	0,09	0,04
losarkol	< BG	k.P	< BG	< BG
lopromid	< BG	k.P	< BG	< BG
lothalamicsäure	< BG	k.P	< BG	< BG
lopentol	< BG	k.P	< BG	< BG
lodixanol	< BG	k.P	< BG	< BG

k.P=keine Probennahme!

9.1.19 Zeitlicher Verlauf der renalen Ausscheidung des applizierten RKM lopromid über den menschlichen Harn

	Probenahmezeit (Applikation 10:00)						Summe Ausscheidung	verabreichte Dosis
	11:30 (g absolut)	13:00 (g absolut)	14:30 (g absolut)	17:15 (g absolut)	19:30 (g absolut)	05:30 (g absolut)	(g absolut)	(g)
lopromid	18,5	7,1	5,0	4,8	1,1	0,5	37,0	40,0
in Prozent	46	18	13	12	3	1	93	100

9.2 Summen- und Strukturformel, Molekulargewicht, CAS-Nummer sowie Massenspektrum der untersuchten RKM, welches zur Quantifizierung verwendet wurde

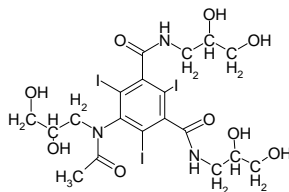
<p>loversol</p> <p>$C_{18}H_{24}I_3N_3O_9$</p> <p>MG: 807 g/mol</p> <p>CAS 87771-40-2</p> 	<p>loversol_050907113833 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 3.79E4 T: + c Full ms2 808.00@21.00 [220.00-1000.00]</p> 
<p>lopamidol</p> <p>$C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$</p> <p>MG: 777 g/mol</p> <p>CAS 60166-93-0</p> 	<p>RKM_200706WH_07 #272-307 RT: 2.82-3.16 AV: 9 NL: 2.21E5 F: + c ESI Full ms2 777.70@23.00 [210.00-1000.00]</p> 
<p>lobitridol</p> <p>$C_{20}H_{28}I_3N_3O_9$</p> <p>MG: 835 g/mol</p> <p>CAS 136949-58-1</p> 	<p>lobitridol_050907101430 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 9.42E4 T: + c Full ms2 836.00@21.00 [230.00-900.00]</p> 

Iohexol

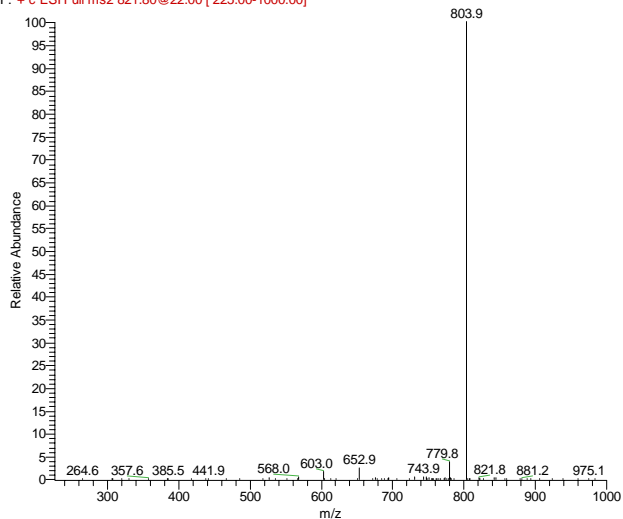
C₁₉H₂₆I₃N₃O₉

MG: 821 g/mol

CAS 66108-95-0



RKM_200706WH_07 #428-452 RT: 4.46-4.67 AV: 6 NL: 6.59E5
F: + c ESI Full ms2 821.80@22.00 [225.00-1000.00]

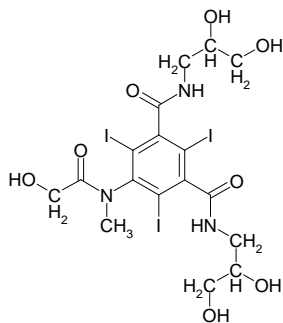


Iomeprol

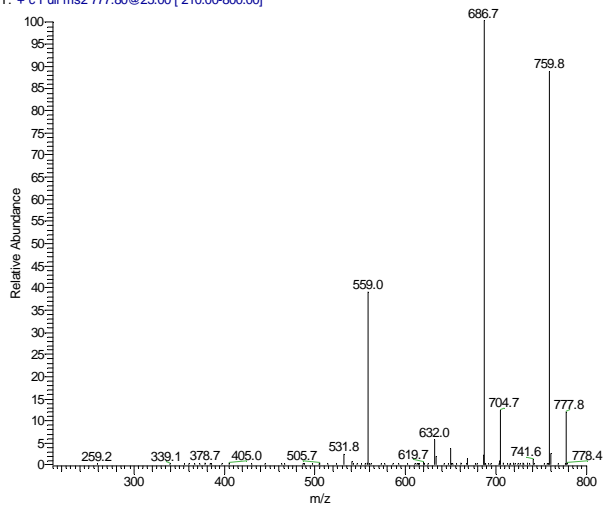
C₁₇H₂₂I₃N₃O₈

MG: 777 g/mol

CAS 78649-41-9



Iomeprol2 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.61E5
T: + c Full ms2 777.80@25.00 [210.00-800.00]

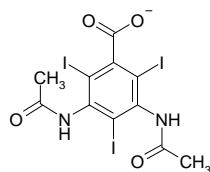


Amidotrizoesäure

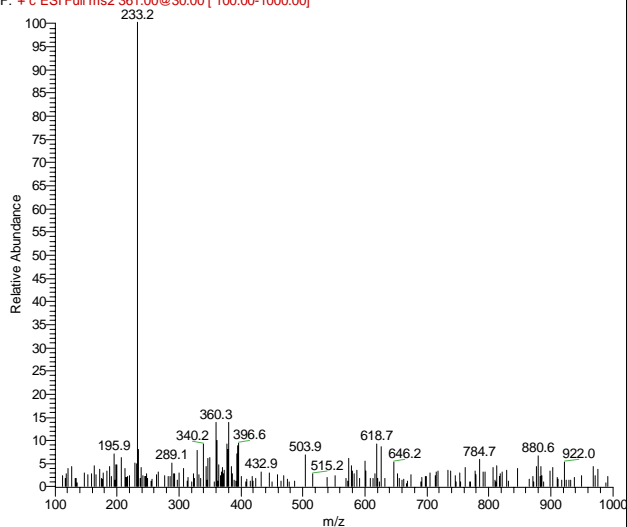
C₁₁H₉I₃N₂O₄

MG: 614 g/mol

CAS



RKM_200706WH_07 #819-966 RT: 8.65-10.15 AV: 24 NL: 6.96E3
F: + c ESI Full ms2 361.00@30.00 [100.00-1000.00]

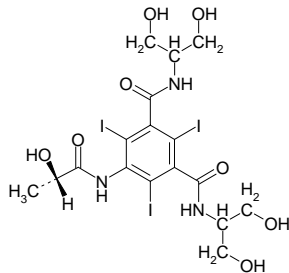


losarkol

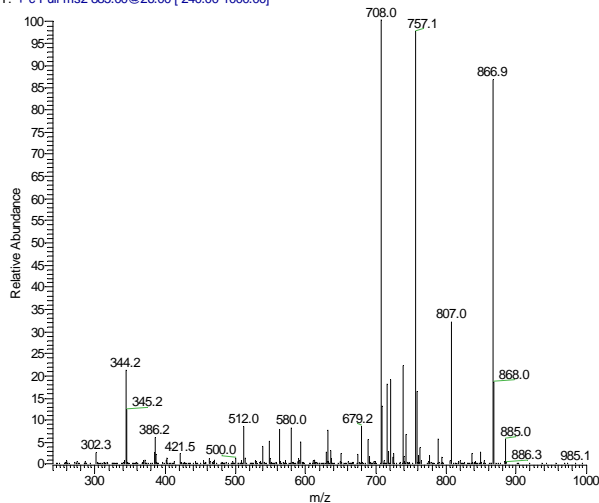
$C_{21}H_{29}I_3N_4O_9$

MG: 862 g/mol

CAS 97702-82-4



losarkol_050907115711 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 4.44E5
T: + c Full ms2 885.00@26.00 [240.00-1000.00]

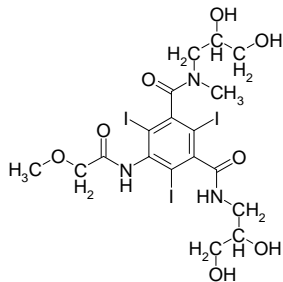


lopromid

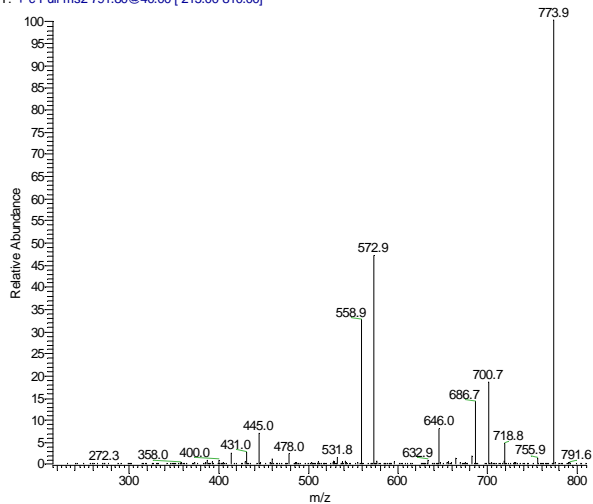
$C_{18}H_{24}I_3N_3O_8$

MG: 791 g/mol

CAS 73334-07-3



lopromid_ES+_MSMS40 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.21E6
T: + c Full ms2 791.80@40.00 [215.00-810.00]

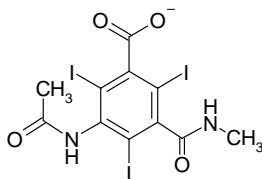


lothalamicsäure

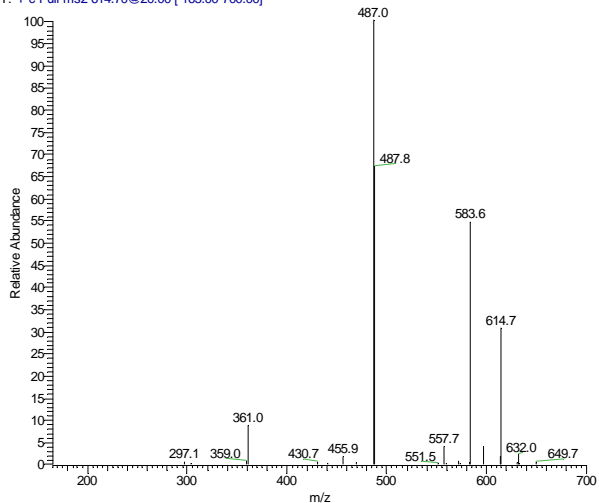
$C_{11}H_9I_3N_2O_4$

MG: 614 g/mol

CAS 2276-90-6



lothamic2 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 4.17E4
T: + c Full ms2 614.70@20.00 [165.00-700.00]

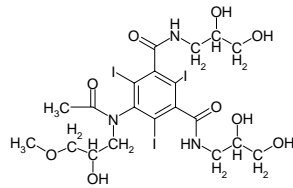


Iopentol

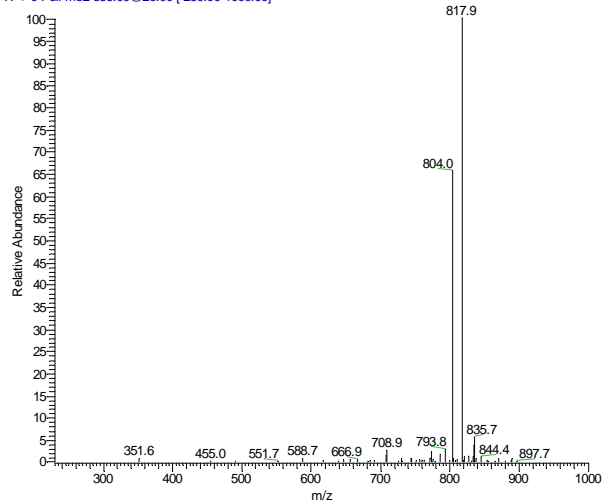
$C_{20}H_{28}I_3N_3O_9$

MG: 835 g/mol

CAS 89797-00-2



Iopentol_050907111731 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 6.04E4
T: + c Full ms2 836.00@20.00 [230.00-1000.00]

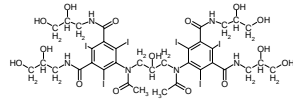


Iodixanol

$C_{35}H_{44}I_6N_6O_{15}$

MG: 1550 g/mol

CAS 92339-11-2



RKM 210706_04 #1553-1671 RT: 16.61-17.85 AV: 20 NL: 1.17E5
F: + c ESI Full ms2 1550.50@23.00 [425.00-2000.00]

